

# IN-VIVO와 IN-VITRO에서의 광독성 시험법의 비교에 대한 연구

이 호, 고 재숙, 박 원재

태 평 양 증 양 연구 소

449-900, 경기도 용인군 기흥읍 보라리 산 1번지

## A STUDY ON A COMPARISON BETWEEN IN - VIVO AND IN - VITRO PHOTOTOXICITY TEST

Lee, Ho, Koh, Jae-Sook and Park, Won-Jae

Pacific R&D Center

San 1, Bora-Ri, Kiheung-Eup, Yongin-Kun, Kyounggi-Do, 449-900, Korea

### 요 약

既知의 광독성 유발 물질 및 자외선 차단제 그리고 수종의 천연물에 대해 in-vitro 와 in-vivo에서 광독성 시험을 하였다. in-vitro 시험은 *C. albicans*와 *S. typhimurium* TA 98 을 이용 광독성 시험을 하였으며, 광조사하는 시료, 시료와 미생물 모두 각각의 시료와 미생물 조사하는 방법을 사용하여 비교하여 보았다. 조사 방법에 따른 유의성은 관찰되지 않았는데, 제한된 시료를 사용했다는 것도 여러 원인중의 하나가 될 수 있다. 한편 사용된 두 균주의 감수성은 *C. albicans*에 비해 *S. typhimurium* TA 98 을 이용했을 때 높게 나타났다. *S. typhimurium* Ta 98 을 이용한 in-vitro method(Method I)와 in-vivo method를 시험 결과 측면에서 볼 때 상관 관계가 높게 나타났다.

## 서 론

우리가 일상 생활에서 많이 접촉하고 있는 물질 중에는 특정한 발색단을 가지고 자외선이나 가시광선을 받아 생체에 광과민반응을 일으키는 것이 있다. 이런 광과민반응은 광독성 반응과 광알러지반응을 포함하고 있고, 전자는 비면역반응, 후자는 면역반응이라는 점에서 대별될 수 있으나, 광알러지반응의 예는 드물다.<sup>1)2)</sup>

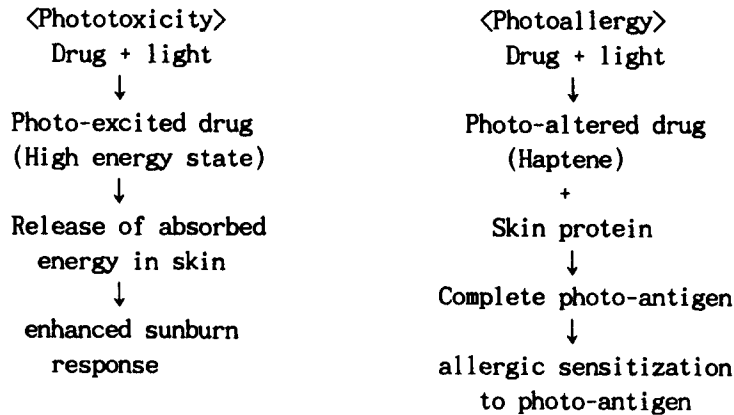


Fig 1. Mechanism of phototoxicity and photoallergy

독성의 유무를 검색하는 방법중에는 인체나 동물을 이용한 것이 있는데, 생체를 이용하는 점에서 위험성을 배제하기 어려우며, 개체특이성이 강하고 결과의 해석이 용이치 않다. 이러한 단점을 극복하고 불필요한 동물 실험을 제한한다는 측면에서 in vitro 대체 시험법이 관심을 받고 있다. 광독성 시험법에서도 Raab의 paramecia를 이용한 광독성 시험법 개발 이후 광독성의 in-vitro 시험법은 꾸준히 개발되어 왔는데, Candida를 응용한 광독성 시험법은 1965년 Daniels<sup>3)</sup>에 의해 소개된 후 현재까지 널리 사용되고 있고 이외에도 lymphocyte<sup>4)</sup>, fibroblast<sup>5)</sup>, RBC<sup>6)</sup>를 사용하는 방법이 있으며 *Salmonella typhimurium* 변이주는 자외선에 의한 DNA 복구 기능이 결여되어 있으므로 자외선에 대한 감수성이 예민하다는 측면에서 착안되어 소개되었다.<sup>7)</sup> 현재 광독성 유발 물질은 Psolaren, Chlorpromazine, Coal tar, Tetracyclin, Benoxaprofen등이 알려져 있고, 이외에도 많은 물질이 광독성을 유발한다고 밝혀져 있으나 광독성은 거의 UV A에 의해 유발된다는 사실때문에 UV B 또는 가시광선에 의해 유발되는 광독성 현상은 간과되어 있다.

본 연구에서는 8-MOP 과 같은 기존의 광독성 유발 물질 및 자외선 차단제 그리고 유발 가능성을 가지고 있는 천연 추출물을 대상으로 UV A 와 UV B를 사용하여 in vivo 와 in vitro 에서의 광독성을 검색하였고 이들의 상관 관계를 비교하여 보았다.

## 재료 및 시험 방법

### 1. 시료

nuclear 에 damage 를 주는 8-methoxy psolaren (Sigma), Cytoplasmic organelle 에 damage 를 주는 anthracene (Sigma), Cell membrane 에 damage 를 주는 hematoporphyrin (Sigma) 등 3가지를 positive control 로 사용하였다. 그의 화장품 원료로써 사용되고 있는 각종 자외선 차단제 및 천연물을 실험 대상으로 하였고, 표 1에 나타내었다. 실험에 사용한 농도는 Dimethyl sulfoxide 또는 ethanol에 10% (W/V) 되게 용해시켜 사용하였다.

### 2. 동물 (guinea pig)을 이용한 광독성 시험

Guinea pig 를 이용한 방법은 Lovell과 Sanders<sup>8)</sup>의 방법을 이용하였고 그 과정은 아래와 같다.

(1) 체중 약 400g 의 hartley 계 guinea pig 등 부위의 털을 clipper 로 1차 제모시키고, 전기 면도기로써 2차 제모시킨다.

(2) 고정기로 고정시킨 다음, 적당한 용매 (DMSO, Ethanol)에 시료를 용해시킨 다음 제모 부위 (2cm X 2cm) 에 2열로 20 $\mu$ l의 시료 용액을 적용 시킨다.

(3) 시료 용액 적용 30분후 한쪽 옆을 aluminium foil 로 덮어 씌우고 광조사를 하는데 UV A 의 경우 2.5mm glass filter 를 사용하여 소량의 UV B 영역 자외선을 filtering 한다.

- . UVA lamp : Philips TL (TL 20W/0.9N) : 305-420 (max 355 nm)
- . UVB lamp : Philips TL/12(TL 20W/12 U.V) : 280-350nm (max 306nm)
- . 조사 장치 : Waldmann UV 800 (Herbert Waldmann GmbH & Co)
- . 측정 기기 : Waldmann UV meter

(4) 광 조사량은 시료를 바르지 않은 상태에서 광 조사만 하여 발적 등의 피부 병변이 나타나지 않는 범위에서 설정하였다. (UVA : 15J/cm<sup>2</sup>, UVB : 50mJ/cm<sup>2</sup>)

(5) 광 조사 직후 및 광 조사후 24시간, 48시간, 72시간 에서의 피부 반응을 관찰하고 72시간까지의 반응 중 최고치를 피부 반응으로 평가한다.

(6) 피부 반응의 평가는 "의약품의 독성 시험 기준"<sup>9)</sup>에 따라 하고 피부 색소 침착 반응은 아래와 같은 기준으로 평가한다.

| 등급 | 피부 반응                    |
|----|--------------------------|
| 0  | non-hyperpigmentation    |
| 1  | mild-hyperpigmentation   |
| 2  | severe-hyperpigmentation |

또한 자극성의 판정은 Draize 의 P.I.I. (Primary Irritation Index) 산출방법<sup>10)</sup>에 따른다.

| 안전성 구분    | 자극성 index (P.I.I)          |
|-----------|----------------------------|
| 0         | non-phototoxic             |
| 0.1 - 0.5 | practically non-phototoxic |
| 0.6 - 1.5 | minimally phototoxic       |
| 1.6 - 3.0 | mildly phototoxic          |
| 3.1 - 5.0 | moderately phototoxic      |
| 5.1 - 6.5 | severely phototoxic        |
| 6.6 - 8.0 | extremely phototoxic       |

### 3. Microorganism 를 이용한 광독성 시험

Candida 를 이용한 광독성 시험은 G.Kavli<sup>11)</sup>등의 방법을 응용하였고 Salmonella 를 이용한 광독성 시험은 문기찬<sup>7)</sup> 방법을 응용하였으며, 아래와 같다.

## METHOD 1

### 1. 균주 준비

(1) *Candida albicans* ATCC 10231을 Sabouraud dextrose agar (이하 SDA) plate 상에서 배양한 뒤(24시간,  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ ), 한 백금이를 따서 멸균 희석수에 넣어 적당히 희석시 킨다.

(2) *Salmonella typhimurium* TA 98 은 Tryptic soy agar (이하 TSA) plate 상에서 배양 한 뒤 (24시간,  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ ), 한 백금이를 따서 멸균 희석수에 넣어 적당히 희석시 키고, 실험前 single colony 분리후 각 유전형질을 확인한다.

① Deep rough (rfa) : crystal violet 10 $\mu$ g 을 직경 6mm 여과지에 흡수시킨 뒤 균이 접종된(2X10<sup>6-7</sup> cells/plate) nutrient agar 상에서 37 °C 배양후 여과지 주위에 투명환의 생성을 확인한다.

② UVR B : petri dish의 agar plate반면을 15W 자외선 살균등 아래 30cm거리에서 6 초간 조사한 뒤 12 시간 배양하여 조사받지 않은 부분에서만 균이 성장되는 것을 확인한다.

③ R-factor

ampicillin 용액 (0.02N NaOH 용액에 8mg/ml의 ampicillin 을 녹인 용액)10 $\mu$ l를 plate표면에 spot하고 건조시킨 뒤 균을 접종하여 24시간 배양한 뒤 ampicillin 에 대해 성장 저해 부위가 생기지 않는 것을 확인한다.

④ histidine 과 biotin 요구성

Minimal glucose agar plate 에 0.1ml 의 0.1M L-histidine 과 0.1ml 의 0.5M biotin을 첨가한 배지와 첨가하지 않은 배지에 균을 접종하여 첨가한 배지에서만 성장하는 것을 확인한다.

\* Minimal glucose agar의 조성

|                 |      |
|-----------------|------|
| agar            | 15g  |
| 50X VB salts    | 20ml |
| 40% glucose     | 50ml |
| distilled water | 1 L  |

\* 50X VB salts

| Ingredient  | per liter |
|---|-----------|
| magnesium sulfate(MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O)  | 10g       |
| citric acid monohydrate   | 100g      |
| potassium phosphate · dibasic(anhydrous, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )                      | 500g      |
| sodium ammonium phosphate(NaH <sub>2</sub> NH <sub>4</sub> PO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O) | 175g      |
| warm distilled water(45°C)  | 670ml     |

(2) Plate 의 준비

1) Candida albicans 의 경우 준비된 SDA plate 에 접종 균액을 떨어뜨리고 glass로 끌고루 펴고, 건조시킨다.

이때  $10^{5-6}$  CFU/plate의 균을 함유하도록 plate 균을 접종시킨다.

2) *Salmonella typhimurium* 은 1)과 동일하게 준비하나 배지는 SDA 대신 TSAagar 를 사용하고, 배지 에는 ampicillin (8mg/ml in 0.02N NaOH)를 3% (W/V)되게 첨가한다.

(3) 직경 0.8 mm 여지에 시료를 30 $\mu$ l 떨어뜨리고, 건조시킨 후 이것을 plate위에 놓는다.

(4) plate 에 자외선을 조사할 때 대조균은 시료가 없는 상태에서 광조사만 받는 균으로 하며 UVA 대조균, UVB 대조균으로 나눈다.

(5) 자외선은 동물을 이용한 광독성 시험에서 사용한 조사장치를 이용하여 조사하고 자외선 조사량은 아래와 같다.

- ┌ C. albicans ATCC 10231 : UVA (60J/cm<sup>2</sup>), UVB (200mJ/cm<sup>2</sup>)
- └ S. typhimurium TA 98 : UVA (5J/cm<sup>2</sup>), UVB (10mJ/cm<sup>2</sup>)

(6) plate에 여지를 놓은뒤 3 - 4시간이 경과한 뒤 C. albicans 는 36 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C에서 48시간 배양하고, S. typhimurium 은 같은 온도에서 24시간 배양한 후 여지 주위에 나타난 투명환의 크기를 측정한다.

(7) 시료균은 시료를 loading 한 뒤 광조사를 한 균으로 하고, 대조균은 시료를 loading 하지 않고 광조사를 한 균으로 한다.

## METHOD 2

. 아래 사항을 제외하고는 Method 1과 동일하다

1) 시료 자체에만 과량의 광을 조사하고 plate 에는 광을 조사하지 않는다.

2) UV 조사량은

UVA (80J/cm<sup>2</sup>), UVB (10J/cm<sup>2</sup>)

3) 시료균은 광조사한 시료를 plate 에 loading 한 것으로 하고, 대조균은 광조사 하지 않은 시료를 plate 에 loading 한 것으로 한다.

## METHOD 3

. 아래의 사항을 제외하고는 Method 1과 동일하다

1) 시료와 plate 에 각각 따로 광조사한다.

2) UV 조사량은 시료에 대해서는 UVA ( $80\text{J}/\text{cm}^2$ ) 와 UVB ( $10\text{J}/\text{cm}^2$ ) 를 조사하고 plate 에 대해서는 *C. albicans* 의 경우 UVA ( $60\text{J}/\text{cm}^2$ ) 와 UVB ( $200\text{mJ}/\text{cm}^2$ )를 조사하고 *S. typhimurium*의 경우 UVA ( $5\text{J}/\text{cm}^2$ ) 와 UVB ( $10\text{mJ}/\text{cm}^2$ )를 조사한다.

3) 시료군은 광조사를 한 시료를 광조사한 균 plate 에 loading 한 것으로 하고 대조군은 광조사를 하지 않은 시료를 광조사한 균 plate 에 loading 한 것으로 한다.

## 결과 및 고찰

### 1. 동물 (guinea pig)을 이용한 광독성 실험

UV B light 에 대한 광독성을 실험하기 위한 예비 실험으로써 Guinea pig 의 MED(minimum erythema dose)를 측정한 결과 (Table 2)  $55\text{mJ}/\text{cm}^2$  이하에서 홍반이 생성되지 않았다. 따라서 Guinea pig 를 이용한 광독성 실험에서의 조사량은  $50\text{mJ}/\text{cm}^2$  로 설정하였다. 한편, UV A light 조사량은 Kaidbey<sup>12)</sup> 방법에 따라  $15\text{J}/\text{cm}^2$  로 설정하였다.

Positive 물질로서 사용된 3가지 시료중 8-MOP 은 UV A light 에 대해 0.01 % (W/V) 이상에서 발적 및 부종 반응을 보였고, UV B light 에 대해선 0.1% (W/V) 이상에서 발적 반응을 보였다. anthracene 도 0.01% (W/V) 이상에서 발적 반응만 보였으며, UV B light 에 대한 반응은 없었다.

또한 hematoporphyrin 은 0.1% (W/V) 이상에서 색소 침착 반응을 보였고 UV B 에 대한 반응은 없었다. 한편 자외선 차단제중 ESCAROL 507 (Octyl dimethyl PABA) 의 UV A light 에 의한 색소 침착 반응을 볼 수 있었고, 천연물의 UV light에 의한 광독성 반응은 볼 수 없었다. (Table 3)

### 2. microorganism 를 이용한 광독성 실험

#### 1) 광량의 설정

UV light 의 적당한 광량을 결정하기 위하여 *C. albicans* 및 *S. typhimurium*에 대해

여러 광량을 조사하여 보았다. (Table 4,5)

Table 4, 5 에 나타난 결과에 따라 *Candida albicans* 와 *Salmonella typhimurium* 에 대한 광량을 아래와 같이 결정하였다.

|                                     | UV A light | UV B light |
|-------------------------------------|------------|------------|
| <i>Candida albicans</i> ATCC 10231  | 60 J       | 200 mJ     |
| <i>Salmonella typhimurium</i> TA 98 | 5 J        | 10 mJ      |

*Salmonella typhimurium* TA 98은 Ampicillin 내성 plasmid 를 갖고 있으므로 광에 의해 plasmid 가 damage 를 받으면 내성을 잃게 된다.

본 시험에서도 이러한 성질을 이용하여 Ampicillin 을 첨가한 결과 첨가하지 않은 경우보다 감수성이 높아졌음을 확인할 수 있었고, Ampicillin 내성 plasmid 가 도입되지 않은 TA 1535, TA 1538 두 균주의 감수성은 Ampicillin 을 첨가하지 않은 TA 98 균주와 감수성이 비슷했다. 따라서 본 시험은 Ampicillin 내성 Plasmid 가 도입된 TA 98 균주를 이용하여 Ampicillin 을 배지에 첨가하는 방법을 사용하였다.

## 2) microorganism 에 대한 광독성 시험

Table 6, 7, 8 을 비교해 보면 방법적인 측면에서 *Salmonella* 와 *Candida* 간의 감수성 차이가 나며, Method I 의 경우 ESCAROL 507 은 *Salmonella* 를 이용한 광독성 시험에서는 투명환이 크게 나타났으나, *Candida* 를 이용한 방법에서는 적게 나타났다. Method II 에서는 Anthracene 은 *Salmonella* 를 이용한 광독성 시험에서는 0.01% 이상에서 광독성이 나타났으나, *Candida* 를 이용한 방법에서는 0.1% 이상에서 투명환이 나타났다. 한편 조사되는 광량도 *S. typhimurium* 에 조사되는 자외선량이 *C. albicans*에 조사되는 자외선량보다 적다. 즉 감수성 측면에서 *Salmonella* 를 이용한 방법이 광독성 유무를 검색하는 데 있어서 보다 효율적이라고 할 수 있다. 한편, 광독성을 유발시키는 원인이 물질 자체의 광흡수에 의한 광화학적 변화에만 기인하는 것이 아니라 대상이 되는 세포의 광화학적 변화도 그 원인이 될 수 있다는 전제하에 Method II, III을 병행하여 보았다. 그러나 방법간의 유의성을 찾을 수 없었는데, 대상 시료의 제한성도 원인중의 하나가 될 수 있을 것으로 생각된다. 양성 대조군으로 사용한 물질(8-MOP, Anthracene, Hematoporphyrin)중 8-MOP과 Anthracene에서는 광독성 반응을 관찰할 수 있었으나, Hematoporphyrin에서는 관찰할 수 없었다. 즉 여기에서 사용된 in - vitro 방법은 nuclear damage 와 cytoplasmic



organelle damage 를 주는 방법인 것을 알 수 있다. 따라서 in - vitro에서의 광독성 유발 물질 검색을 위해서는 mechanism에 따른 다양한 시험법이 필요할 것으로 생각된다.

Table 6, 7, 8 에서 나타난 결과를 토대로 방법적인 면을 검토해 보기 위해, 광독성이 관찰된 시료들을 중심으로 Table 9 에 정리하여 보았다.

Method I 과 In-vivo 의 방법을 비교하여 보면, 시료간 그리고 시료의 광독성 유발도에 따라 상당히 상관 관계가 높은 것을 알 수 있고 시험 결과 측면에서 상관 관계 계수는 0.869이었다. (fig 2.)

현재 광독성 시험을 위해 주로 사용하고 있는 in-vivo 방법은 적용 시료가 대개 화장품 또는 그 원료이므로 국소적 피부 반응에 국한해서 하고 있다. 그러나 이런 화장품이라 하더라도 점막이나 피부의 1차 barrier 기능이 상실된 곳에 적용되거나 경구를 통해 섭취했을 경우 반응 양상은 달라지며 소화, 대사작용을 통해 전신적으로 확산된다.

그러므로, in-vivo 방법도 시료 적용 방법 (epidermal layer 제거, intradermal, intraperitoneal, oral injection)에 따라 시험할 필요성이 있고, 또한 UV B 에 의한 광독성인 경우는 UV B 에 의한 MED 가  $50\text{mJ}/\text{cm}^2$  정도이므로 상당히 조사량이 적은 편이다. 따라서 시료 자체에만 광 조사를 더하는 방법도 고려해 볼 수 있다.

이처럼, 광독성 예상 물질을 검색하기 위해서는 시료 적용 방법에 따른 다양한 in-vivo 방법이 필요하겠고, in-vivo 에서의 시험 결과와 상관 관계가 높고, 보다 신뢰성이 높은 광독성 유, 무에 대한 판정을 in-vitro에서 하기 위해서는 mechanism 에 따른 다양한 시험법을 사용하여야할 것으로 사료된다.

## ABSTRACT

Phototoxicity is a complex phenomenon which may involve photochemical reaction and biological response mechanism. This complexity and animal protecting tendency has led to the development of various in-vitro approaches as sensitive, alternative test to the in-vivo phototoxicity test. In this study, we investigated not only the sensitivity of two microorganism, (C.albicans and S.typhimurium TA 98 about UV) but also a correlation between in-vitro and in-vivo phototoxicity test using UV A and UV B. Furthermore, we studied the effect of irradiation method which were as follows ;

- 1) irradiate to material and microorganism, simultaneously
- 2) irradiate to only material
- 3) irradiate to material and microorganism, respectively

In each irradiation method, it showed no significant difference. However we were able to observe the more sensitive phototoxicity in *Slythimurium* TA 98 than *C.albicans*, and the results of in-vitro test using *S.typhimurium* TA 98 had a good correlation with those of in-vivo test.

### 참고 문헌

1. 심상철, 고훈영, 화학과 공업의 진보, Vol. 22, No.3, p136-153 (1982)
2. Michael Jarratt, International Journal of Dermatology, Vol.15 (June), p317-325(1976)
3. Daniels. F Jr, A simple microbiological method for demonstrating phototoxic compounds., J Invest Dermatol, 44:259-263(1965)
4. Tayyaba, H, Irene, E.K, Daniel, J. M, Barry, S.C, Dorina. A., Mechanism of tetracyclin phototoxicity, J Invest Dermatol, 83:179-183(1984)
5. Richard, M.L, R.Rivkah, Edward, C.G., Quantitative in vitro assessment of phototoxicity by a fibroblast - neutral red assay, J Invest Dermatol, 98:725-729(1992)
6. Hetherington, A.M, Johnson, B.E., Photohemolysis, Photodermatology, 1:255-260(1984)
7. 박현철, 문기찬, 김수남, 대한 피부 과학 회지, 제 26권, 제 5호, p629-633 (1988)
8. W.W. Lovell and D.J.Sanders, Phototoxicity testing in guinea-pigs, Fd Chem. Toxic., 30:155-160(1992)
9. 국립 보건 안전 연구원, 의약품 등의 독성 시험 기준, 국립 보건 안전 연구원 예규 제 10호, 국립 보건 안전 연구원 (1988)
10. Draize.J.H., Appraisal of the safety of chemical in foods, Drugs and Cosmetics.,  
The staff of the Division of Pharmacology, Food and Drug Education and Welfare.

Pub. (1959)

11. G. Kavli & G. Volden, *Photodermatology*, 1:204 (1984)
12. Kligman. A.M., and Kaidbey. K.H., *J. Natl. Cancer Inst.*, 69:269-272 (1982)

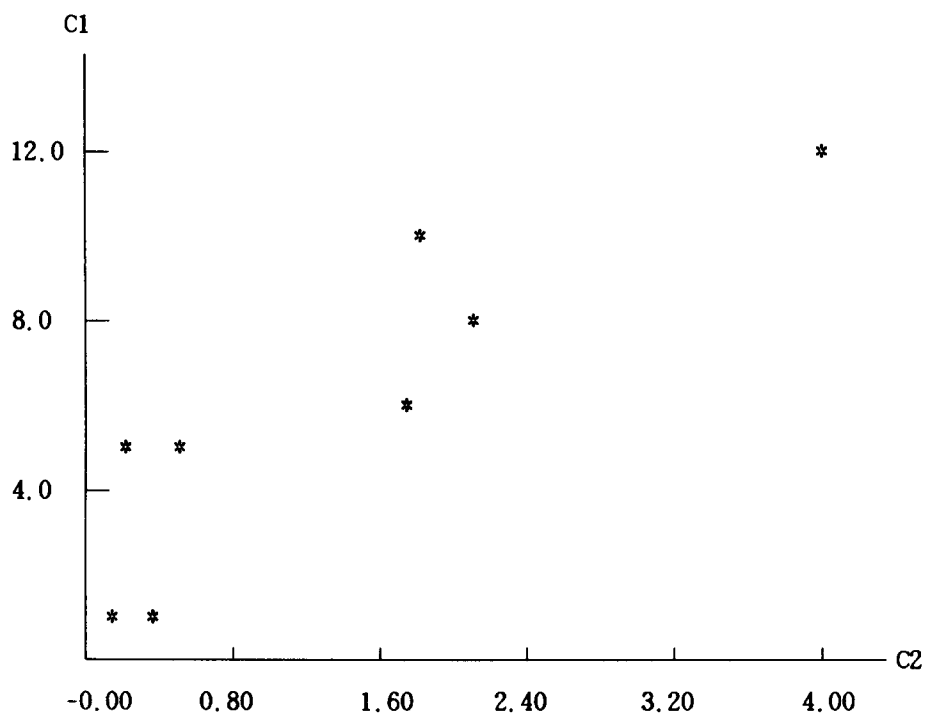


Fig 2. The correlation between in-vitro and in-vivo test

\*C<sub>1</sub> = mean response of In-vitro method

C<sub>2</sub> = clear zone of In-vivo method

Table 1. Cosmetic raw materials used in Phototoxicity test

| Kind             | material                    | maker    |
|------------------|-----------------------------|----------|
| Sunscreens       | ESCAROL 507 <sup>TM</sup>   | VANDYK   |
|                  | PARSOL MCX <sup>TM</sup>    | GIVAUDAN |
|                  | EUSOLEX 4360 <sup>TM</sup>  | MERCK    |
|                  | PARSOL 1789 <sup>TM</sup>   | GIVAUDAN |
|                  | UVINUL T-150 <sup>TM</sup>  | BASF     |
|                  | UVINUL DS- 49 <sup>TM</sup> | "        |
|                  | ASL-24S <sup>TM</sup>       | OGAWA    |
| Natural extracts | UVINUL D-50 <sup>TM</sup>   | BASF     |
|                  | ROSEMARY EXT.               | AMI      |
|                  | HORSTAIL EXT.               | "        |
|                  | CHARMOMILE EXT.             | "        |
|                  | EUCALYPTUS EXT.             | "        |
|                  | MARONIE EXT.                | "        |

\* ESCAROL 507(Octyl dimethyl PABA)

PARSOL MCX(Ethyl hexyl p-methoxy cinnamate)

EUSOLEX 4360 (Oxybenzone)

PARSOL 1789 (Butyl-4-methoxy dibenzoyl methane)

UVINUL T-150 (Octyl triazone)

UVINUL DS-49 (Disodium 2,2'-dihydroxy-4,4'-dimethoxy-5,5'-disulfo benzophenone)

ASL-24S (2-hydroxy-4-methoxy benzophenone-5-sodium sulfate)

**Table 2.** The measurement of MED by UV B light on Guinea Pig

| No. of animals | Dose of irradiation |    |    |    |    |    |
|----------------|---------------------|----|----|----|----|----|
|                | 110                 | 92 | 74 | 55 | 37 | 26 |
| 1              | ±                   | ±  | ±  | -  | -  | -  |
| 2              | ±                   | ±  | -  | -  | -  | -  |
| 3              | ±                   | -  | -  | -  | -  | -  |
| 4              | ±                   | -  | -  | -  | -  | -  |
| 5              | -                   | -  | -  | -  | -  | -  |

\* ± : mild erythema

**Table 3.** Phototoxicity evaluation using Guinea pig on various cosmetic raw materials and well-known phototoxic agents.

| Material (W/V, %)    | Guinea - Pig                          |           |           |           |
|----------------------|---------------------------------------|-----------|-----------|-----------|
|                      | UV A                                  | Control A | UV B      | Control B |
| 8-MOP 0.1%           | 5/5 <sup>a)</sup> (4.0) <sup>b)</sup> | 0/5 (0.0) | 2/4 (1.0) | 0/4 (0.0) |
| " 0.01%              | 3/3 (1.7)                             | 0/3 (0.0) | 0/4 (0.0) | 0/4 (0.0) |
| " 0.001%             | 0/3 (0.0)                             | 0/3 (0.0) | 0/4 (0.0) | 0/4 (0.0) |
| Anthracene 0.1%      | 5/5 (2.0)                             | 0/5 (0.0) | 0/4 (0.0) | 0/4 (0.0) |
| " 0.01%              | 3/3 (1.7)                             | 0/3 (0.0) | 0/4 (0.0) | 0/4 (0.0) |
| " 0.001%             | 0/3 (0.0)                             | 0/3 (0.0) | 0/4 (0.0) | 0/4 (0.0) |
| Hematoporphyrin 0.1% | 2/3 (0.3)                             | 0/3 (0.0) | 0/4 (0.0) | 0/4 (0.0) |
| " 0.01%              | 0/3 (0.0)                             | 0/3 (0.0) | 0/4 (0.0) | 0/4 (0.0) |
| " 0.001%             | 0/3 (0.0)                             | 0/3 (0.0) | 0/4 (0.0) | 0/4 (0.0) |
| ESCAROL 507™ 10%     | 4/5 (0.4)                             | 0/5 (0.0) | 0/3 (0.0) | 0/3 (0.0) |
| PARSOL MCX™ 10%      | 0/5 (0.0)                             | 0/5 (0.0) | "         | "         |
| EUSOLEX 4360™ 10%    | "                                     | "         | "         | "         |
| PARSOL 1789™ 10%     | "                                     | "         | "         | "         |
| UVINUL T-150™ 10%    | "                                     | "         | "         | "         |
| UVINUL DS-49™ 10%    | "                                     | "         | "         | "         |
| ASL-24S™ 10%         | "                                     | "         | "         | "         |
| UVINUL D-50™ 10%     | "                                     | "         | "         | "         |
| ROSEMARY Ext. 10%    | "                                     | "         | "         | "         |
| HORSTALI Ext. 10%    | "                                     | "         | "         | "         |
| CHARMOMILE Ext. 10%  | "                                     | "         | "         | "         |
| EUCALYPTUS Ext. 10%  | "                                     | "         | "         | "         |
| MARONIE Ext. 10%     | "                                     | "         | "         | "         |

$$\text{a) fractional response} = \frac{\text{number of positive animals}}{\text{number of tested animals}}$$

$$\text{b) mean response} = \frac{\text{total score}}{\text{number of tested animals}}$$

**Table 4.** The Dose of irradiation on phototoxicity test using *Candida albicans* ATCC 10231

| UV Source | Irradiance            |          |          |          |          |                       |
|-----------|-----------------------|----------|----------|----------|----------|-----------------------|
| UV A      | 20<br>a) <sub>+</sub> | 40<br>+  | 60<br>+  | 80<br>+  | 100<br>+ | (J/cm <sup>2</sup> )  |
| UV B      | 100<br>+              | 200<br>+ | 400<br>± | 600<br>± | 800<br>± | (mJ/cm <sup>2</sup> ) |

\* a) growth like control group

**Table 5.** The Sensitivity of *Salmonella typhimurium* on UV light

| Strain                      | UV Source          | Dose of irradiation |    |    |    |    |     |     |     |                       |
|-----------------------------|--------------------|---------------------|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----------------------|
| <i>S. typhimurium</i> TA 98 | UV A               | 1                   | 5  | 10 | 20 | 30 | 40  | 60  | 80  | (J/cm <sup>2</sup> )  |
| "                           | Am <sup>+</sup> a) | +                   | +  | +  | +  | +  | +   | +   | +   |                       |
| "                           | Am <sup>-</sup> b) | +                   | +  | +  | +  | +  | +   | +   | +   |                       |
| " TA 1535                   | UV A               | +                   | +  | +  | +  | +  | +   | +   | +   |                       |
| " TA 1538                   | UV A               | +                   | +  | +  | +  | +  | +   | +   | +   |                       |
| "                           | UV B               | 9                   | 18 | 25 | 50 | 75 | 100 | 150 | 200 | (mJ/cm <sup>2</sup> ) |
| " TA 98                     | Am <sup>+</sup>    | +                   | ±  | ±  | ±  | ±  | -   | -   | -   |                       |
| "                           | Am <sup>-</sup>    | +                   | +  | ±  | ±  | ±  | -   | -   | -   |                       |
| " TA 1535                   | UV B               | +                   | +  | ±  | ±  | ±  | -   | -   | -   |                       |
| " TA 1538                   | UV B               | +                   | +  | ±  | ±  | ±  | -   | -   | -   |                       |

\* a) Am<sup>+</sup>: Ampicillin (8mg/ml in 0.02N NaOH) was added as 3% conc.

b) growth like control group



Table 6. The Results of Phototoxicity test in Method I<sup>a)</sup>

| Material(W/V, %)               | Salmonella typhimurium TA 98 |                  |           |      | Candida albicans ATCC 10231 |      |           |      |
|--------------------------------|------------------------------|------------------|-----------|------|-----------------------------|------|-----------|------|
|                                | Control A                    | UV A             | Control B | UV B | Control A                   | UV A | Control B | UV B |
| 8-MOP 0.1%                     | -                            | 13 <sup>b)</sup> | -         | -    | -                           | 13   | -         | -    |
| " 0.01%                        | -                            | 10               | -         | -    | -                           | 10   | -         | -    |
| " 0.001%                       | -                            | 5                | -         | -    | -                           | 6    | -         | -    |
| Anthracene 0.1%                | -                            | 8                | -         | -    | -                           | 8    | -         | -    |
| " 0.01%                        | -                            | 6                | -         | -    | -                           | 5    | -         | -    |
| " 0.001%                       | -                            | -                | -         | -    | -                           | -    | -         | -    |
| Hematoporphyrin 0.1%           | -                            | -                | -         | -    | -                           | -    | -         | -    |
| " 0.01%                        | -                            | -                | -         | -    | -                           | -    | -         | -    |
| " 0.001%                       | -                            | -                | -         | -    | -                           | -    | -         | -    |
| ESCAROL 507 <sup>TM</sup> 10%  | 1                            | 6                | -         | -    | 1                           | 3    | -         | -    |
| PARSOL MCX <sup>TM</sup> 10%   | -                            | -                | -         | -    | -                           | -    | -         | -    |
| EUSOLEX 4360 <sup>TM</sup> 10% | -                            | -                | -         | -    | -                           | -    | -         | -    |
| PARSOL 1789 <sup>TM</sup> 10%  | -                            | -                | -         | -    | -                           | -    | -         | -    |
| UVINUL T-150 <sup>TM</sup> 10% | -                            | -                | -         | -    | -                           | -    | -         | -    |
| UVINUL DS-49 <sup>TM</sup> 10% | -                            | -                | -         | -    | -                           | -    | -         | -    |
| ASL-24S <sup>TM</sup> 10%      | -                            | -                | -         | -    | -                           | -    | -         | -    |
| UVINUL D-50 <sup>TM</sup> 10%  | 11                           | 12               | -         | -    | 4                           | 6    | 12        | 13   |
| " 1%                           | 6                            | 7                | -         | -    | -                           | -    | 7         | 8    |
| " 0.1%                         | -                            | -                | -         | -    | -                           | -    | -         | -    |
| ROSEMARY Ext. 10%              | -                            | -                | -         | -    | -                           | -    | -         | -    |
| HORSETAIL Ext. 10%             | -                            | -                | -         | -    | -                           | -    | -         | -    |
| CHARMOMILE Ext. 10%            | -                            | -                | -         | -    | -                           | -    | -         | -    |
| ENCALYPTUS Ext. 10%            | -                            | -                | -         | -    | -                           | -    | -         | -    |
| MARONIE Ext. 10%               | -                            | -                | -         | -    | -                           | -    | -         | -    |

a) Method I : Irradiation after loading material on plate

b) clear zone after treatment(mm) - clear zone before treatment(mm)

Table 7. The Results of Phototoxicity test in Method II <sup>a)</sup>

| Material (W/V, %)              | S. typhimurium TA 98 |      |         | C. albican ATCC 10231 |      |         |
|--------------------------------|----------------------|------|---------|-----------------------|------|---------|
|                                | UV A                 | UV B | Control | UV A                  | UV B | Control |
| 8-MOP 0.1%                     | 14 <sup>b)</sup>     | -    | -       | 9                     | -    | -       |
| " 0.01%                        | 9                    | -    | -       | 2                     | -    | -       |
| " 0.001%                       | 7                    | -    | -       | -                     | -    | -       |
| Anthracene 0.1%                | 6                    | -    | -       | 4                     | -    | -       |
| " 0.01%                        | 4                    | -    | -       | -                     | -    | -       |
| " 0.001%                       | -                    | -    | -       | -                     | -    | -       |
| Hematoporphyrin 0.1%           | -                    | -    | -       | -                     | -    | -       |
| " 0.01%                        | -                    | -    | -       | -                     | -    | -       |
| " 0.001%                       | -                    | -    | -       | -                     | -    | -       |
| ESCAROL 507 <sup>TM</sup> 10%  | 7                    | -    | -       | 1                     | -    | -       |
| PARSOL MCX <sup>TM</sup> 10%   | -                    | -    | -       | -                     | -    | -       |
| EUSOLEX 4360 <sup>TM</sup> 10% | -                    | 2    | -       | 1                     | -    | 1       |
| PARSOL 1789 <sup>TM</sup> 10%  | -                    | 1    | -       | -                     | -    | -       |
| UVINUL T-150 <sup>TM</sup> 10% | -                    | -    | -       | -                     | -    | -       |
| UVINUL DS-49 <sup>TM</sup> 10% | 2                    | -    | 1       | -                     | 2    | 1       |
| ASL-24S <sup>TM</sup> 10%      | 4                    | -    | 3       | 1                     | 2    | 1       |
| UVINUL D-50 <sup>TM</sup> 10%  | -                    | -    | -       | -                     | -    | -       |
| ROSEMARY Ext. 10%              | -                    | -    | -       | -                     | -    | -       |
| HORSETAIL Ext. 10%             | -                    | -    | -       | -                     | -    | -       |
| CHARMOMILE Ext. 10%            | -                    | -    | -       | -                     | -    | -       |
| ENCALYPTUS Ext. 10%            | -                    | -    | -       | -                     | -    | -       |
| MARONIE Ext. 10%               | -                    | -    | -       | -                     | -    | -       |

a) Method II : Irradiation to only material

b) clear zone after treatment(mm) - clear zone before treatment(mm)

Table 8. The Results of Phototoxicity test in Method III<sup>a)</sup>

| Material (W/V, %)              | S. typhimurium TA 98 |                  |           |      |
|--------------------------------|----------------------|------------------|-----------|------|
|                                | Control A            | UV A             | Control B | UV B |
| 8-MOP 0.1%                     | -                    | 12 <sup>b)</sup> | -         | -    |
| " 0.01%                        | -                    | 8                | -         | -    |
| " 0.001%                       | -                    | 5                | -         | -    |
| Anthracene 0.1%                | -                    | 7                | -         | -    |
| " 0.01%                        | -                    | 4                | -         | -    |
| " 0.001%                       | -                    | -                | -         | -    |
| Hematoporphyrin 0.1%           | -                    | -                | -         | -    |
| " 0.01%                        | -                    | -                | -         | -    |
| " 0.001%                       | -                    | -                | -         | -    |
| ESCAROL 507 <sup>TM</sup> 10%  | -                    | 7                | -         | -    |
| PARSOL MCX <sup>TM</sup> 10%   | -                    | -                | -         | -    |
| EUSOLEX 4360 <sup>TM</sup> 10% | 1                    | 1                | -         | -    |
| PARSOL 1789 <sup>TM</sup> 10%  | 1                    | 1                | -         | -    |
| UVINUL T-150 <sup>TM</sup> 10% | -                    | -                | -         | -    |
| UVINUL DS-49 <sup>TM</sup> 10% | 1                    | -                | -         | -    |
| ASL-24S <sup>TM</sup> 10%      | 1                    | -                | -         | -    |
| UVINUL D-50 <sup>TM</sup> 10%  | 7                    | 6                | 6         | 6    |
| " 1%                           | 5                    | 4                | 5         | 6    |
| " 0.1%                         | 2                    | 2                | 2         | 2    |
| ROSEMARY Ext. 10%              | -                    | -                | -         | -    |
| HORSETAIL Ext. 10%             | -                    | -                | -         | -    |
| CHARMOMILE Ext. 10%            | -                    | -                | -         | -    |
| ENCALYPTUS Ext. 10%            | -                    | -                | -         | -    |
| MARONIE Ext. 10%               | -                    | -                | -         | -    |

a) Method III : Irradiation to material and microorganism, respectively

b) clear zone after treatment(mm) - clear zone before treatment(mm)

Table 9. The comparison of the results from In-vitro phototoxicity test using UV A light

| material                  | (W/V, %) | Method I           |                    | Method II |      | Method III | In-Vivo                               |
|---------------------------|----------|--------------------|--------------------|-----------|------|------------|---------------------------------------|
|                           |          | STPY <sup>a)</sup> | CALB <sup>b)</sup> | STPY      | CALB | STPY       | guinea pig                            |
| 8 - MOP                   | 0.1      | 13 <sup>c)</sup>   | 13                 | 14        | 9    | 12         | 5/5 <sup>d)</sup> (4.0) <sup>e)</sup> |
| 8 - MOP                   | 0.01     | 10                 | 10                 | 9         | 2    | 8          | 3/3 (1.7)                             |
| 8 - MOP                   | 0.001    | 5                  | 6                  | 7         | -    | 5          | 0/3 (0.0)                             |
| Anthracene                | 0.1      | 8                  | 8                  | 6         | 4    | 7          | 5/5 (2.0)                             |
| Anthracene                | 0.01     | 6                  | 5                  | 4         | -    | 4          | 3/3 (1.7)                             |
| Anthracene                | 0.001    | -                  | -                  | -         | -    | -          | 0/3 (0.0)                             |
| Hematoporphyrin           | 0.1      | -                  | -                  | -         | -    | -          | 2/3 (0.3)                             |
| ESCAROL 507 <sup>TM</sup> | 10       | 5                  | 2                  | 7         | 1    | 7          | 4/5 (0.4)                             |

a) STPY : Salmonella typhimurium TA 98

b) CALB : Candida albicans ATCC 10231

c) clear zone after treatment (mm) - clear zone before treatment (mm)

d) fractional response = 
$$\frac{\text{number of positive animals}}{\text{number of tested animals}}$$

e) mean response = 
$$\frac{\text{total score}}{\text{number of tested animals}}$$