

CAMVA (Chorioallantoic Membrane Vascular Assay)를 이용한 계면활성제의 자극 평가에 관한 연구

고재숙, 안수선, 박종호

((주)태평양 기술연구원)

In vitro test using Chorioallantoic Membrane Vascular Assay to assess the irritancy potential of surfactants

Jae-sook Koh, Su-sun An, Jong-ho Park
(Pacific R&D Center)

요 약

생체내 피부 자극은 일련의 복합적인 생리 화학적 변화를 수반한다. 이러한 생체내 현상을 보다 민감하게 반영하고, 동물 시험 경감 측면 및 정확성, 재현성을 보완하기 위하여 자극 물질 검색을 위한 대체 시험법이 필요하게 되었다. CAMVA는 이러한 필요성에 의해 고안된 방법의 하나로써 약 10일된 유정란의 복합적인 혈관이 융합된 장노막 (CAM)내에 자극 물질을 투여하고 일정 시간 후, 막 내 혈관의 충혈 (Congestion), 출혈 (Haemorrhage), 응집현상 (Coagulation) 등의 변화를 통해 자극 정도를 평가하는 *in vitro* 시험계이다.

본 연구에서는 화장품 영역에서 중요한 위치를 차지하는 계면활성제 (surfactant)의 자극 정도를 검색하여 *in vitro* 시험법인 CAMVA와 *in vivo* 시험법 (Intradermal Safety Test, Human Primary Irritation Test)간의 상관성을 조사하였으며, 그 결과 매우 높은 상관성을 나타냄을 알 수 있었다($r=0.90$, $r=0.89$). 그러므로 CAMVA는 안 자극 시험의 대체 시험법 뿐만 아니라 피부자극의 예측에도 적용 가능한 유용한 시험법이라 생각된다.

1. 서 론

화장품은 대개 건강한 정상인들이 일상적으로 사용하는 제품이므로 안전성의 확보는 대단히 중요한 문제이다. 현재까지 화장품의 안전성을 확보하기 위한 수단으로 인체피부를 이용한 시험 및 동물을 이용한 시험이 보편적으로 수행되어 왔다.^{1,2,3} 인체 피부를 이용한 시험의 경우 실제 사용조건에서의 피부자극을 예견할 수 있다는 장점이 있으나 많은 시간의 소요, 시험대상자 간의 개체차이, 시험자의 주관적인 요인이 개입되는 점, 자극이 강한 물질의 경우 시험대상자에게 고통을 주는점 및 자극수준이 낮은 물질들간을 비교할 때 반복노출이 아닌 일차노출에 의해서는 그 차이가 명확하지 않다는 단점이 있다.^{4,11,12} 동물을 이용한 시험의 경우는 사람에서 나타나는 결과와 정확히 일치하지는 않지만 임상시험 전단계로 시행되고 있다. 그러나 동물시험은 환경 및 동물 보호차원에서 사회적 비난에 직면하고 있고, 또한 유럽의 ECCD(European Community Cosmetics Directive)의 6차 개정안에서도 1998년부터 모든 동물 시험을 중지하고 대체시험법을 적용하기로 결정하였다고 한다.¹⁰ 반면 국내의 경우 이에 대한 구체적인 논의는 아직까지 이루어지지 않고 있는 실정이다.

동물 시험을 감소시켜야 한다는 기본 개념은 1959년 Russel과 Buch에 의해 제안된 3R's (Replacement, Reduction, Refinement)에 잘 나타나있다. 동물 시험을 줄이고자 하는 노력에 의하여 *in vitro* 대체 시험법에 대한 관심이 증가되고, 실제로 현재까지 안점막 자극과 피부 자극에 관한 여러 가지 *in vitro* 시험법이 개발되었다.^{5,8,13}

피부 자극 및 안점막 자극에 관한 다양한 *in vitro* 시험법의 판단기준은 생물학적인 이론 배경에 따라 몇가지 범주로 나눌 수 있다. Frazier 등은 현재까지 개발된 *in vitro* 시험계의 안독성 발현과정을 세포 수준의 반응들을 기준으로 다음과 같이 Morphology, Cell toxicity assay, Cell and tissue physiology, Inflammation, Immunity, Recovery, Repair, 등으로 분류하였고 피부 자극에 관해서는 이용되는 수단에 따라 Structure-activity, Biochemical, Cellular, Tissue, Lower vertebrate 또는 invertebrate 등으로 분류하였다.^{9,13}

Chorioallantoic membrane vascular assay (CAMVA)는 본래 안점막 자극을 평가하기 위해 사용되는 *in vivo* 시험법인 Draze method의 대체 시험법으로 제안된 것인데 결과를 빠르게 얻을 수 있다는 점과 특히 불용성인 최종 제품을 실험할 수 있는 점때문에 그 유용성이 주목받고 있다.^{6,7} CAMVA는 장노막 맥관계 (CAM Vasculature) 내에서의 변화를 출혈 (Hemorrhage)이나 혈관의 손상정도에 따라 자극정도를 평가

한다. CAM을 이용한 또 다른 방법으로 Hen's Egg Test-CAM (HET-CAM)이 있는데 이 방법은 실험 시작에서 결과 도출까지 5분안에 이루어진다는 신속성에 장점을 가지고 있다. 현재까지 CAMVA의 이용은 안결막 염증 유발정도를 판단하는데 주로 활용되어왔으나 CAMVA가 살아있는 조직을 이용한 실험방법이고, 막구조를 가지고 있으므로 시료의 흡수에 대한 1차적인 barrier기능이 있다는 점에 주목하여 피부 자극을 예측하는 시험법으로의 적용 가능성을 고려해 보게 되었다.

본 연구에서는 화장품 영역에서 중요한 위치를 차지하는 계면활성제를 가지고 각각의 자극 정도를 *in vivo* 시험법 (Intradermal Safety test, Human Primary Irritation test)과 CAMVA와의 비교시험을 행함으로써 CAMVA의 유용성을 확인하였다.

2. 시험 방법

2.1. 시료 설명

본 시험에 사용한 계면활성제는 다음과 같다.

(1) 비이온 계면활성제 : POE(10) Oleyl Ether

POE(10) Nonylphenyl Ether

POE(10) Monooleate

POE(10) Monostearate

(2) 음이온 계면활성제 : Disodium Cocamido Monoisopropanolamine sulfosuccinate

Sodium Lauryl Sulfate

Ammonium Laureth(3) sulfate

Sodium Laureth(3) sulfate

(3) 양이온 계면활성제 : Cetyl Trimethyl Ammonium Chloride

Distearyl Dimethyl Ammonium Chloride

Behenyl Trimethyl Ammonium Chloride

Stearyl Trimethyl Ammonium Chloride

(4) 양성이온 계면활성제 : Disodium Cocoamphodipropionate

Cocamido Propyl Betain/Glycerol Laurate

Lauryl Dimethyl Amine Oxide

Disodium Cocamphodiacetate

2.2. 시험 방법

2. 2. 1 CAM Vascular Assay⁶⁷

1) 유정란의 준비

수정후 10 - 14 일이 된 유정란을 구입하여 사용하였고, 구입후 시험시까지 37.8 °C에서 60%의 습도를 유지하면서 보관하였다.

2) 시험과정

준비된 유정란의 기낭(air sac)에 구멍을 낸 후 껍질을 1.5 × 1.5 cm 정도의 크기로 잘라내어 장노막 (chorioallantoic membrane, CAM)이 드러나도록 하였다. 외부로 드러난 장노막 (CAM) 위에 teflon ring을 놓은 후 시료를 투여하기 이전의 상태를 관찰하였다. 이후 시험하고자하는 각각의 계면활성제(1% 수용액)를 40 µl씩 teflon ring내에 투여하고 parafilm으로 덮어 한시간동안 방치한 후에 CAM내의 혈관변화양상을 관찰하고 다음과 같은 평가기준에 의하여 자극정도를 평가하였다.

3) 판정

장노막 (CAM)의 혈관 변화를 관찰하고 다음과 같이 점수를 준다.

점수	반 응 양 상
0	변화 없음
1.0	가벼운 혈관 팽창 or 혈관 축소
2.0	심한 혈관 팽창 or 혈관 축소
3.0	약한 혈관 파괴 (부분적 출혈)
4.0	심한 혈관 파괴 (완전 출혈)
5.0	약한 경결 반응 (부분적 단백질 변성)
6.0	심한 경결 반응 (완전 단백질 변성, 막파괴)

각각의 유정란에 대하여 부여한 점수를 평균하여 다음과 같이 시험물질의 자극을 평가한다.

평균점수	평 가
0 - 0.9	Non - irritant
1.0 - 1.9	Slight irritant
2.0 - 2.9	Mild irritant
3.0 이상	Severe irritant

2. 2. 2 Intradermal Safety Test^{14,15}

1) 토끼의 준비

시험에 사용한 토끼는 2 kg 내외의 체중을 갖는 것으로 피부의 상태가 좋은 New Zealand White Rabbit을 사용하였다

2) 시험과정

시험전일 토끼의 등부위 털을 제모한 후 생리식염수로 희석한 1% Evan's blue 용액을 4 ml/kg의 농도로 토끼 귀에 정맥주사 하였다. 정맥주사 직후 시험할 계면활성제 (1% 수용액)를 토끼의 등부위 좌우측에 시료당 0.1 ml씩 주사한 후 한시간 동안 상온에 방치하였다. 이후 토끼를 치사시키고 등부위 피부를 박리하여 초자 판상위에 뒤집어 펼친 후 관찰하여 자극정도를 평가하였다.

3) 판정

결과의 해석은 다음과 같고 직경은 장경과 단경의 합을 2로 나눈값이다.

① Blued Area (BA) : 색소가 누출되어 파랗게 보이는 부분의 직경

점수	Blued Area (직경, mm)
0	색소 누출 반응이 관찰되지 않음.
0.2	색소 누출 반응의 흔적이 관찰됨.
0.5	0 - 3.0
1.0	3.1 - 5.0
1.5	5.1 - 7.0
2.0	7.1 - 9.1
2.5	9.1 - 11.0
3.0	11.0 - 13.0
3.5	13.1 - 15.0
4.0	15.1 - 17.0
4.5	17.1 - 19.0
5.0	19.1 이상

② Non blued Area (NA)

: 경결반응에 의해 희게 보이는 부분의 직경

점수	Nonblued Area (mm)
+ 0.2	0 - 2.0
+ 0.5	2.1 - 4.0
+ 1.0	4.1 이상

③ Color Intensity (CI)

: 색소 누출 정도에 따른 색의 강도

점수	Color Intensity
- 0.5	light blue
0	normal
+ 0.5	deep blue

Total injured area (TIA)는 BA, NA, CI의 합 (=BA+NA+CI)으로 나타내며, 시험물질의 자극 정도는 다음과 같은 기준에 의해 판단한다.

④ 판정

TIA	판 정
0 - 0.9	non-irritant (무자극)
1.0 - 1.9	slight irritant (경자극)
2.0 - 2.9	mild irritant (중자극)
3.0 이상	severe irritant (강자극)

2. 2. 3 Human Primary Irritation Test⁴

1) 시험대상자

본 연구소에서 근무하고 있는 직원 중 20세 - 30세의 건강한 여성, 남성 50명을 대상으로 실시하였다. 단, 건선 (psoriasis), 여드름 (acne), 습진 (eczema), 기타 피부병 등의 보유자나 임신, 수유부 또는 피임제, 항히스타민제 등을 복용하고 있는 사람은 제외시켰다.

2) 첩포 재료

첩포에 사용한 chamber는 Epitest Ltd. co (Paijala SF-04300 Hyryla Finland)에서 제조한 Finn chamber (no. 52268)이고, 테이프는 3M / Medical-Surgical Division의 Micropore tape을 사용하였다.

3) 시험방법

- ① 시험 부위는 70% 에탄올로 세척한뒤 건조시켰다.
- ② 준비된 1%의 시험 물질 수용액 20 μ 를 finn chamber 내에 적하시킨 후 등 부위에 얹어 micropore tape 으로 고정시켰다.

③ 시험 물질은 24시간 동안 패쇄접촉하고, 결과의 관찰은 접촉 제거 30분 후와 24시간 후에 행하였다.

4) 판정기준

관찰은 접촉제거 24시간 후와 48시간 후에 행하며 피부 반응은 국제 접촉 피부염 연구회 (International Contact Dermatitis Research Group : ICDRG) 의 규정에 따라 판정하였다.

기 호	판 정 기 준
±	의심스러운 반응, 미미한 홍반 등.
+	약한반응(소수포를 동반하지않음), 홍반, 구진
++	강한반응(소수포를 동반함), 홍반, 구진, 소수포
+++	매우 강한 양성반응, 대수포 반응
-	음성

5) 판정

점수	판 정
0 - 0.9	non-irritant (무자극)
1.0 - 1.9	slight irritant (경자극)
2.0 - 2.9	mild irritant (중자극)
3.0 이상	severe irritant (강자극)

3. 결과 및 고찰

In vitro 시험법인 CAMVA와 *in vivo* 시험법으로 계면활성제에 대한 자극정도를 조사한 결과는 Table 1, 2, 3과 같다. 본 연구에 사용한 각 계열별 계면활성제의 자극정도는 일반적으로 알려진 바와 같이 음이온계가 가장 높고 비이온계가 가장 낮은 자극반응을 나타내었다.

장노막 (CAM)을 이용한 *in vitro* 시험결과 (Table 1, Fig. 1, 2, 3, 4) 계면활성제

에 따라서 다양한 혈관 변화가 관찰되었다. 양이온계인 distearyl dimethyl ammonium chloride에서는 혈관 팽창 (Fig. 2)이 관찰되었고, 양성이온계인 cocamido propyl betain/glycerol laurate에서는 부분 출혈 (Fig. 3), lauryl dimethyl amine oxide에서는 전체적인 출혈 (Fig. 4)등의 변화가 관찰되었으며, 자극이 낮은 계면활성제에 대해서는 혈관변화가 미미하였다. 각 계열별 계면활성제에 대하여 살펴본 결과, 비이온계의 경우는 POE(10) oleyl ether와 POE(10) nonylphenyl ether가 POE(10) monooleate와 POE(10) monostearate에 비해 높은 자극을 나타내어 ether계열이 ester 계열보다 자극이 높음을 알 수 있었으며, aromatic ring을 포함하는 POE(10) nonylphenyl ether의 자극이 가장 높았다. 음이온계에 있어서는 disodium cocamido MIPA amido sulfosuccinate의 자극이 가장 낮았고 sodium염 (sodium laureth(3) sulfate)보다는 ammonium염 (ammonium laureth sulfate)의 자극이 높았다. 양이온계의 경우 자극 정도는 분자량이 증가함에 따라 감소하는 양상을 나타내었고, 양성이온계에 있어서는 lauryl dimethyl amine oxide의 자극이 특히 높았다.

본 시험결과에서 나타난 바와 같이 시험에 사용된 계면활성제에 대해서 CAMVA는 *in vivo*와 유의한 상관성을 보이고 있는데, Spearman's rank correlation으로 알아볼때 intradermal safety test와는 상관계수(r)가 0.90 ($p=0.000$)이고, 인체 일차자극 시험과는 상관계수(r)가 0.89 ($p=0.000$)였다. *In vivo*방법인 intradermal safety test의 경우는 항염증물질을 검색하기위한 수단으로 약리학 영역에서 널리 이용되고 있으나^{14,15} 피부가 가지고 있는 barrier 기능을 반영하지 못한다는 한계점이 있는 반면 장노막 (CAM)은 혈관계와 barrier 기능을 하는 막구조를 가지고 있으므로 CAMVA는 intradermal safety test의 단점을 보완하고, 인체 일차 자극시험을 대체, 보완할 수 있는 시험법으로서 유용하다고 생각된다.

4. 결 론

1. *In vitro* 시험법인 CAMVA에 의해 계면활성제의 자극 정도를 검색한 결과, 각 이온 계열 및 구조에 따라 다른 양상을 나타내었는데 그 경향은 *in vivo*시험에서 얻은 결과와 유의한 상관성이 있음을 알 수 있었다 (intradermal safety test : $r=0.90$, 인체 일차자극 시험 : $r=0.89$).

2. 장노막 (CAM)내에 투여되는 자극물질의 자극정도에 따라 혈관팽창, 출혈, 경결 반응(응집현상), 혈관축소 및 소멸현상이 관찰되었다.
3. CAMVA는 안점막 자극에 대한 대체시험법뿐만 아니라 피부자극을 예측하기 위한 시험법으로도 유용할 것으로 보인다.

Abstract

Skin irritations accompany the series of complex, physical and chemical changes. Alternative methods which reflect the biological phenomenon more sensitively are necessary for the purpose of reducing the animal tests and improving the accuracy and reliability. Chorioallantoic membrane (CAM) vascular assay is a *in vitro* method which utilizes the chorioallantoic membrane of hen's fertilized egg of about 10 days old. Test substances are placed directly onto the surface of the CAM and 1 hour later the CAM vasculature is subjectively evaluated to determine with a chemically related-injurious response including the appearance of haemorrhage, congestion, coagulation, and so on.

In this research, using the various surfactants, the correlations of CAMVA with *in vivo* models (intradermal safety test and human primary irritation test) were investigated. And CAMVA closely correlated to intradermal safety test ($r=0.89$) and human primary irritation test ($r=0.90$). From the result, it seems that CAMVA can also be used as a method for predicting the skin irritations.

참 고 문 헌

1. Anderson, K. E. and H. I. Maibach. Contact Derm., 6, pp. 430-434, 1980
2. CTFA safety Testing Guideline : The Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association, Inc., Washington, D.C. 20023, 1991

3. Dupris, G. and C. Benezra. Allergic contact dermatitis to simple chemicals : A molecular approach. Marcel Dekker, New York, 1982
4. Fisher, T., and H. Maibach. Contact Derm. 11, pp. 137-140, 1984
5. Frazier, J. M., S. C. Gad, A. M. Goldberg and J. P. McCulley. A critical evaluation of alternatives to acute ocular testing, in alternative methods in toxicology. Vol. 4, Mary Ann liebert, New York, 1987
6. Price, J. B., M. P. Barry and I. J. Andrews. Fd. Chem. Toxic. 24, pp. 503-505, 1986
7. Lawrence, R. S., M. H. Groom, D. M. Ackroyd and W.E. Parish. Fd Chem. Toxic. 24, pp. 497-502, 1986
8. Bason, M. M. , V. Gordon, and H. I. Maibach. International Journal of Dermatology. Vol 30, pp. 623-626. 1991
9. Marzuli, F. N. and H. I. Maibach, : Fd. Cosmet. Toxicol., 13, pp. 533-540, 1975
10. Muscatiello, M. J. and D. M. Bagley. Proceedings of the 2nd CTFA ocular safety testing workshop : Evaluation of in vitro alternatives, 1991
11. Nater J. P. and A. C. De Groot. Unwanted Effects of Cosmetics and Drugs used in Dermatology. Elsevier Science Publisher B. V. : pp. 91-165, 1985
12. Russel, W. M. S. and R. L. Burch. The principles of human experimental technique. London, Methuen & Co. Ltd., 6, 1959
13. Stephen D. Gettings. Cosmetics & Tolletrles, : 107 : 71-83, 1992
14. 鈴木 守. Fragrance J. 사, pp. 91-165, 1987
15. 二官博義, 小林嗣郎. Fragrance Journal 8, 55-60, 1992

Table 1. Results of CAMVA with Surfactants

Materials	CAMVA						Score	Assess.
	n = 1	n = 2	n = 3	n = 4	n = 5			
1. POE(10) Oleyl Ether	1	1	1	2	1	1.2	Slight	
2. POE(10) Nonylphenyl Ether	2	1	2	1	1	1.4	"	
3. POE(10) Monooleate	0	1	1	1	1	0.8	Non-irritant	
4. POE(10) Monostearate	1	0	0	1	0	0.4	"	
5. Disodium Cocamido MIPA Sulfosuccinate	2	3	3	3	2	2.6	Mild	
6. Sodium Lauryl Sulfate	4	5	4	6	6	5.0	Severe	
7. Ammonium Laureth(3) sulfate	4	5	5	4	4	4.4	"	
8. Sodium Laureth(3) sulfate	4	4	5	4	4	4.2	"	
9. Cetyl Trimethyl Ammonium Chloride	5	6	5	5	6	5.4	"	
10. Distearyl Dimethyl Ammonium Chloride	2	2	3	3	2	2.4	Mild	
11. Behenyl Trimethyl Ammonium Chloride	2	3	3	3	2	2.6	"	
12. Stearyl Trimethyl Ammonium Chloride	5	6	5	6	6	5.6	Severe	
13. Disodium Cocoamphodipropionate	3	2	3	4	3	3.2	"	
14. Cocamido Propyl Betain/Glycerol Laurate	3	4	4	4	3	3.6	"	
15. Lauryl Dimethyl Amine Oxide	4	5	5	5	5	4.8	"	
16. Disodium Cocamphodiacetate	4	4	4	4	5	4.2	"	
17. Saline(Negative Control)	0	0	0	0	0	0	Non-irritant	

* 1, 2, 3, 4 : Nonionic Surfactants (1 % in Aq. Soln)

* 5, 6, 7, 8 : Anionic Surfactants (" ")

* 9,10,11,12 : Cationic Surfactants (" ")

*13,14,15,16 : Amphoteric Surfactants (" ")

Table 2. Results of Intradermal Safety Test with Surfactants

Materials	Intradermal Safety Test						Score	Assess.
	n = 1	n = 2	n = 3	n = 4	n = 5			
1. POE(10) Oleyl Ether	3.5	4.0	4.5	3.7	4.2	4.0	Severe	
2. POE(10) Nonylphenyl Ether	4.0	3.5	3.5	3.2	3.5	3.5	"	
3. POE(10) Monooleate	2.5	2.5	2.0	2.7	2.5	2.4	Mild	
4. POE(10) Monostearate	1.5	2.0	2.0	1.5	2.0	1.8	Slight	
5. Disodium Cocamido MIPA Sulfosuccinate	2.7	2.7	2.5	2.5	2.7	2.6	Mild	
6. Sodium Lauryl Sulfate	4.5	5.2	5.7	5.0	5.0	5.1	Severe	
7. Ammonium Laureth(3) sulfate	4.5	4.5	5.0	5.5	5.5	5.0	"	
8. Sodium Laureth(3) sulfate	4.5	4.5	4.0	4.0	4.5	4.3	"	
9. Cetyl Trimethyl Ammonium Chloride	5.5	4.5	5.0	5.0	5.0	5.0	"	
10. Distearyl Dimethyl Ammonium Chloride	2.5	2.5	2.7	2.5	2.5	2.6	Mild	
11. Behenyl Trimethyl Ammonium Chloride	2.5	2.5	3.0	3.0	3.0	2.8	"	
12. Stearyl Trimethyl Ammonium Chloride	5.5	5.5	5.5	6.0	6.0	5.7	Severe	
13. Disodium Cocoamphodipropionate	4.0	3.5	3.5	3.7	3.7	3.7	"	
14. Cocamido Propyl Betain/Glycerol Laurate	4.0	3.5	4.0	4.2	4.0	3.9	"	
15. Lauryl Dimethyl Amine Oxide	6.0	5.5	5.5	5.5	6.0	5.7	"	
16. Disodium Cocamphodiacetate	4.5	5.0	4.5	4.5	4.5	4.6	"	
17. Saline(Negative Control)	0	0	0	0	0	0	Non-irritant	

* 1, 2, 3, 4 : Nonionic Surfactants (1 % in Aq. Soln)

* 5, 6, 7, 8 : Anionic Surfactants (" ")

* 9,10,11,12 : Cationic Surfactants (" ")

*13,14,15,16 : Amphoteric Surfactants (" ")

Table 3. Results of Human Primary Irritation Test with Surfactants

Materials	Human Primary Test						Assess.	
	24 hr			48 hr				Mean Score n=50
	±	+	+++	±	+	+++		
1. POE(10) Oleyl Ether	3	-	-	-	-	-	0.8	Non irritant
2. POE(10) Nonylphenyl Ether	5	-	-	-	-	-	1.3	Slight
3. POE(10) Monooleate	2	-	-	-	-	-	0.5	Non irritant
4. POE(10) Monostearate	1	-	-	-	-	-	0.3	"
5. Disodium Cocamido MIPA Sulfosuccinate	8	-	-	-	1	-	2.3	Mild
6. Sodium Lauryl Sulfate	6	4	-	-	3	1	9.8	Severe
7. Ammonium Laureth(3) sulfate	6	-	-	-	9	2	7.9	"
8. Sodium Laureth(3) sulfate	6	-	-	-	6	2	6.7	"
9. Cetyl Trimethyl Ammonium Chloride	8	1	-	-	-	-	2.5	Mild
10. Distearyl Dimethyl Ammonium Chloride	8	-	-	-	-	-	2.0	"
11. Behenyl Trimethyl Ammonium Chloride	5	-	-	-	1	-	2.5	"
12. Stearyl Trimethyl Ammonium Chloride	5	11	-	-	5	10	21.7	Severe
13. Disodium Cocoamphodipropionate	8	-	-	-	-	-	2.0	Mild
14. Cocamido Propyl Betain/Glycerol Laurate	9	-	-	-	-	-	2.5	"
15. Lauryl Dimethyl Amine Oxide	5	2	-	-	6	2	7.9	Severe
16. Disodium Cocamphodiacetate	4	-	-	-	4	-	2.1	Mild
17. Saline(Negative Control)	-	-	-	-	-	-	0	Non-irritant

* 1, 2, 3, 4 : Nonionic Surfactants (1 % in Aq. Soln)
 * 5, 6, 7, 8 : Anionic Surfactants (" ")
 * 9,10,11,12 : Cationic Surfactants (" ")
 *13,14,15,16 : Amphoteric Surfactants (" ")

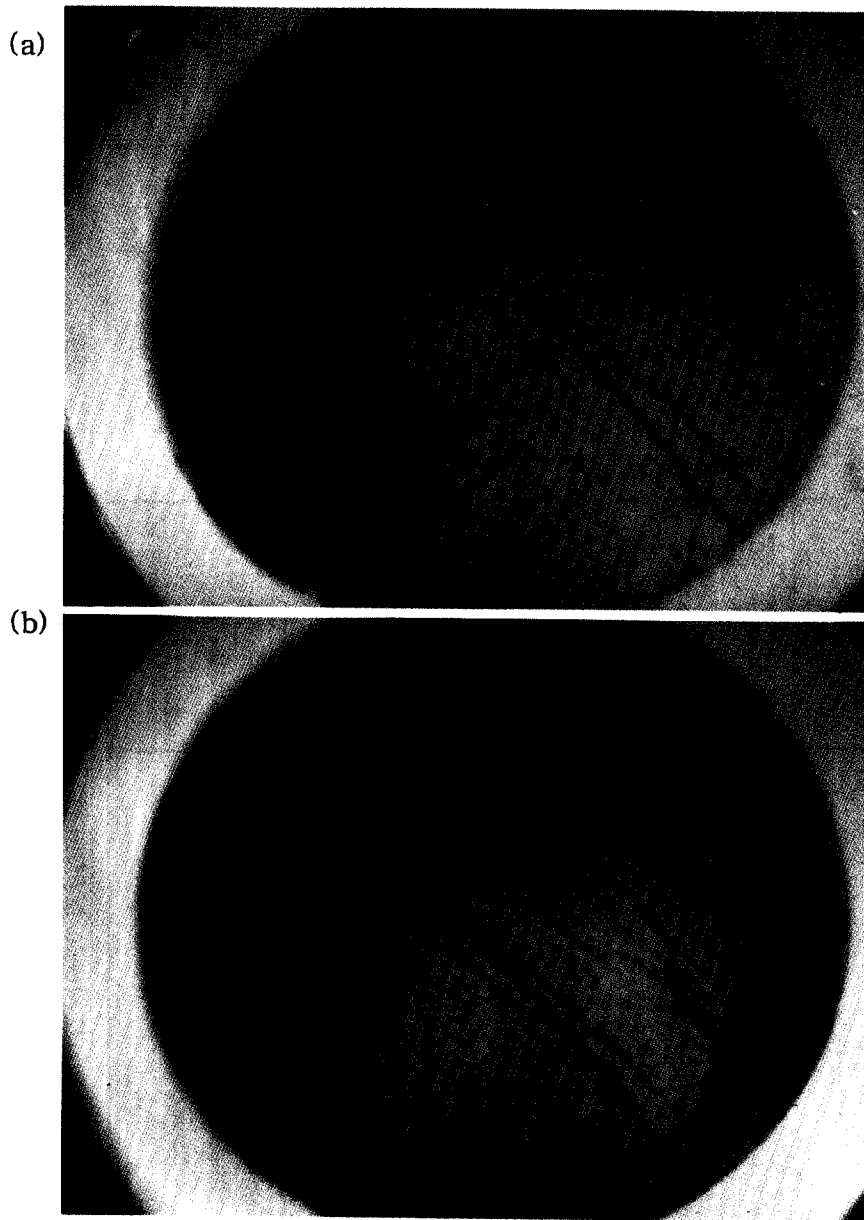


Fig. 1. There are no changes of vasculature of chorioallantoic membrane (CAM) before (a) and 1 hour after (b) treatment with saline (negative control).

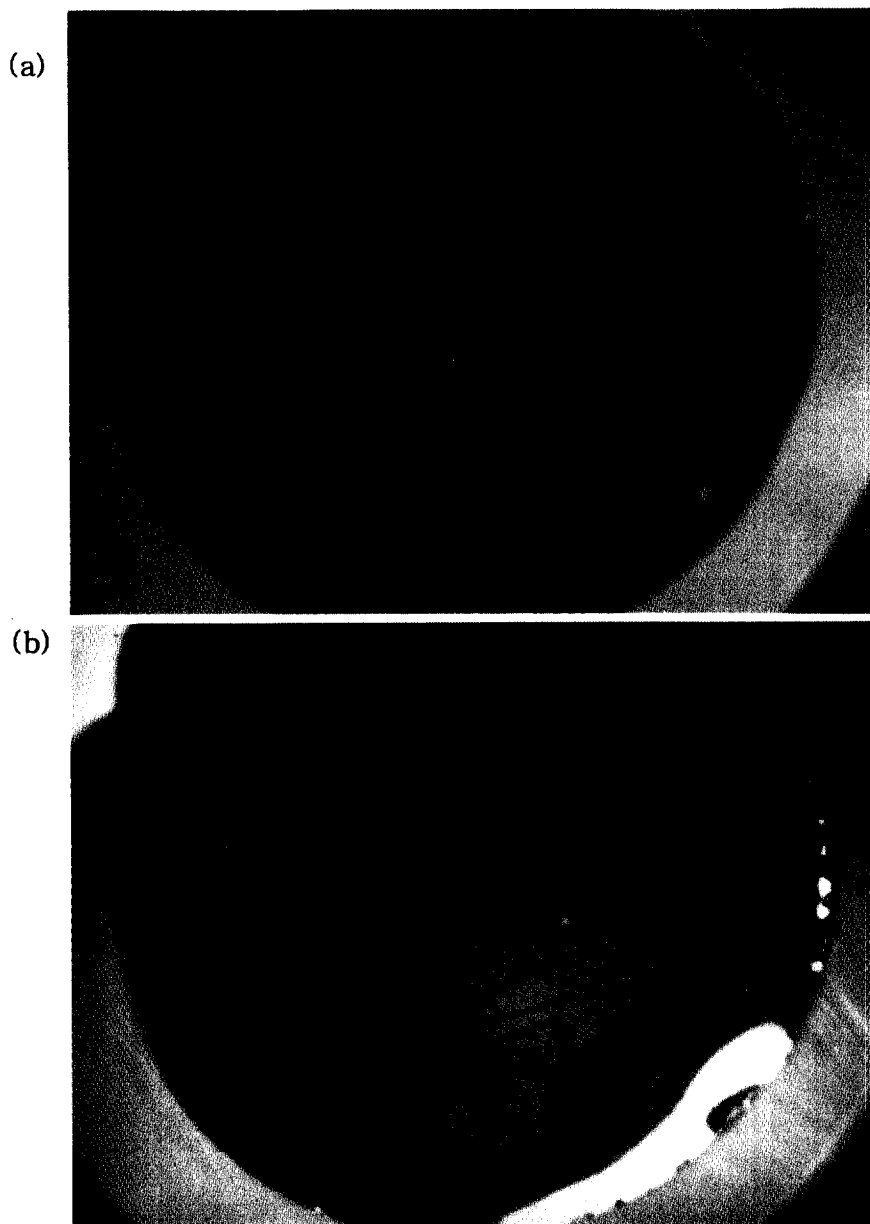


Fig.2. There are vasodilation of vasculature of chorioallantoic membrane (CAM) before (a) and 1 hour after (b) treatment with 1% distearyl dimethyl ammonium chloride in saline.

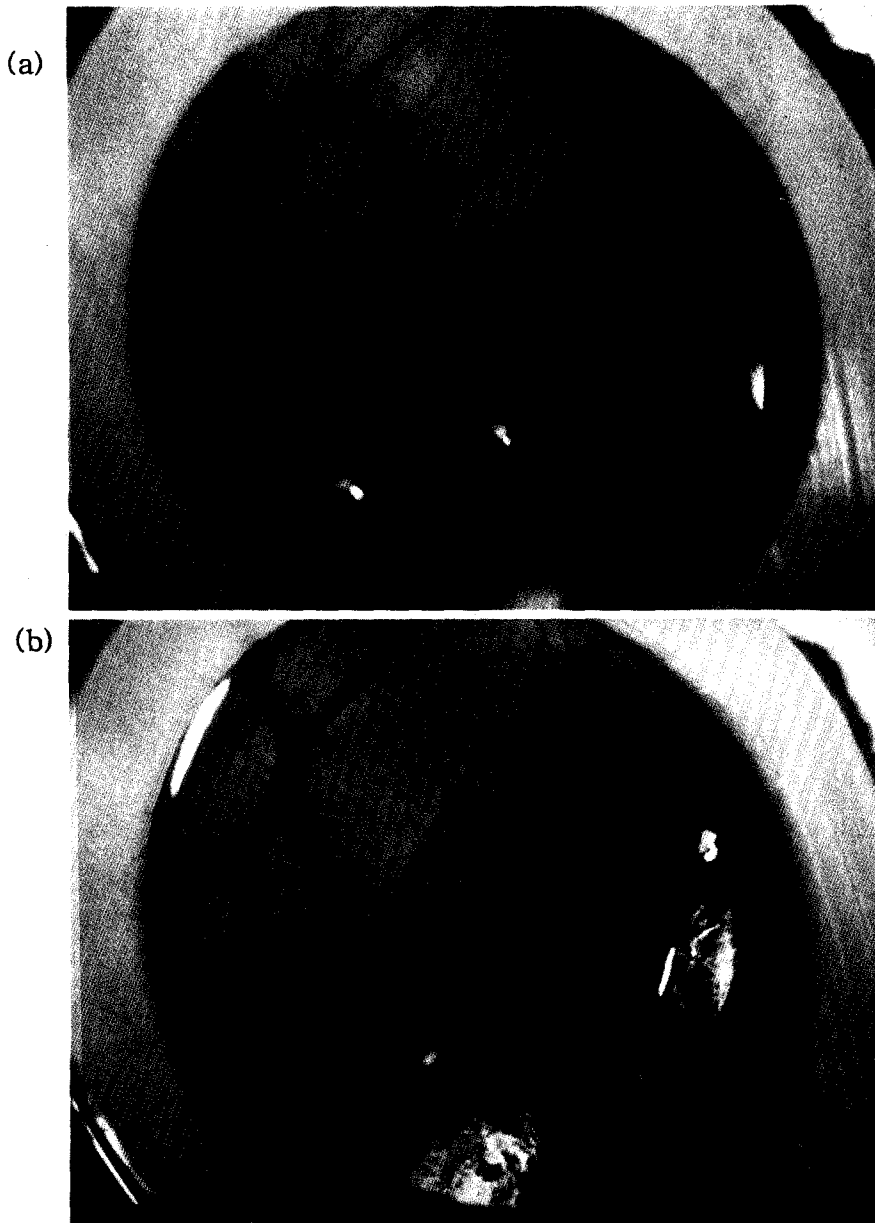


Fig. 3. There are partial haemorrhages of vasculature of chorioallantoic membrane (CAM) before (a) and 1 hour after (b) treatment with 1% cocamido propyl betain/glycerol laurate in saline.

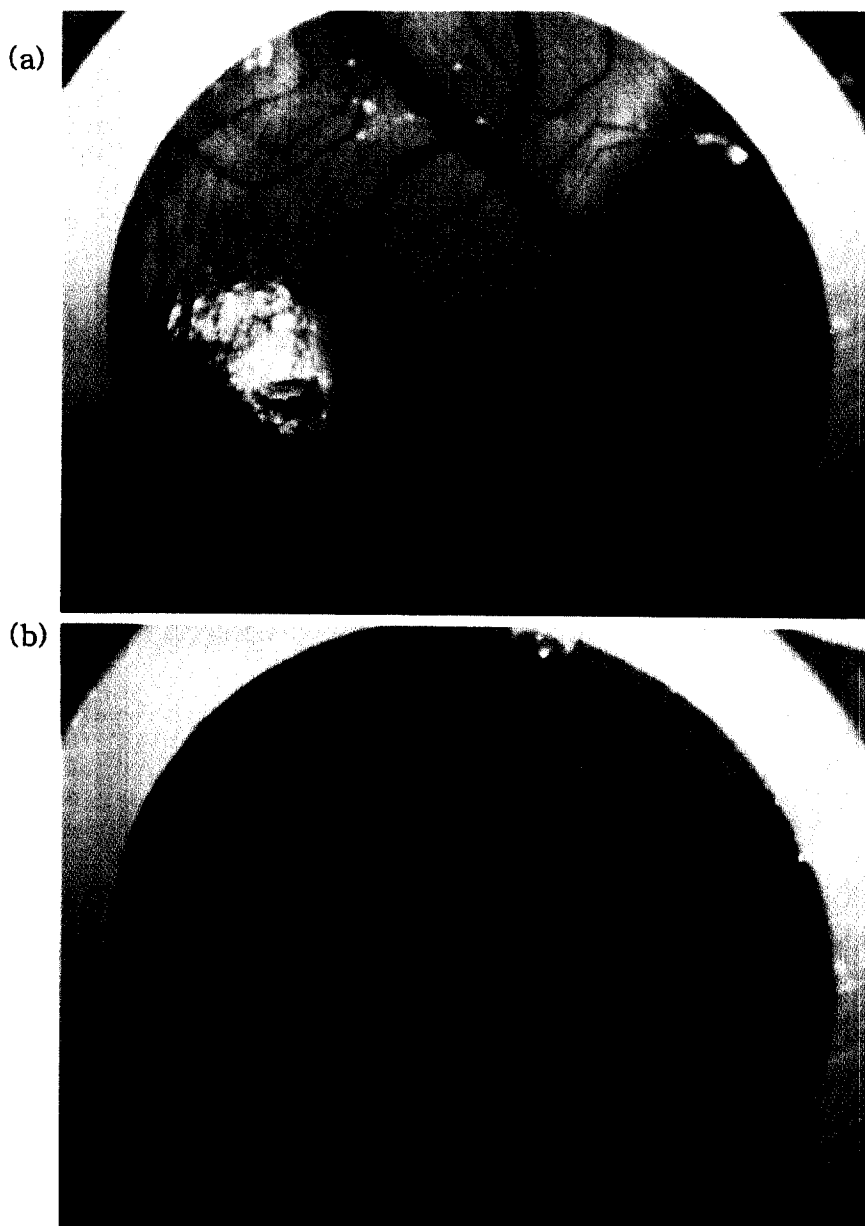


Fig. 4. There are partial haemorrhages of vasculature of chorioallantoic membrane (CAM) before (a) and 1 hour after (b) treatment with 1% lauryl dimethyl amine oxide in saline.