

화장품 원료의 피부자극성과 세포독성의 관련성

이은희 · 이종권 · 김용규 · 박기숙 · 안광수 · 정경미 ·

정해관 · 이선희 · 정수연 · 홍진태[#]

식품의약품안전청 국립독성연구소

(Received April 24, 2001; Revised May 24, 2001)

Correlation Between Skin Irritation and Cytotoxicity of Anti-wrinkle Agents

Eun Hee Lee, Jong Kwon Lee, Yong Kyu Kim, Ki Sook Park, Kwang Soo Ahn,
Kyoung Mi Jung, Jung Hai Kwan, Sun Hee Lee,
Soo Youn Chung and Jin Tae Hong[#]

Department of Toxicology, National Institute of Toxicological Research, Korea Food and
Drug Administration, 5 Nokbun-Dong, Eunpyung-Ku, Seoul 122-704, Korea

Abstract — To compare skin irritation and cytotoxicity of anti-wrinkle agents, we examined skin irritation of six anti-wrinkle agents (ascorbic acid, glycolic acid, all *trans*-retinoic acid, ginseng extract, retinol, EB) in New Zealand white rabbit. Cytotoxicity of these agents was determined by MTT [tetrazolium salt 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] at multi-time points in cultured HaCaT cell, a human immortalized keratinocyte cell. We then analyzed correlation between skin irritation and cytotoxicity by spearman's rank correlation analysis. All *trans*-retinoic acid showed the highest primary irritation index (0.92) in skin irritation test. Being all the six agents not irritant, retinol showed the most cytotoxic agents. The correlation between skin irritation and cytotoxicity (IC₅₀) at different time point was 0.814, 0.757, 0.814 and 0.7 at 3, 24, 48 and 72 h, respectively. We also found that IC₂₀ and IC₈₀ of these agents showed similar correlation with skin irritation. These results therefore demonstrated that there is close correlation between skin irritation and cytotoxicity IC₅₀ value by MTT in HaCaT cell at early time points by anti-wrinkle agents or IC₂₀ value. IC₅₀ at early time point or IC₂₀ values may be reliable alternative determinant of skin irritation.

Keywords □ Skin irritation, anti-wrinkle agents, cytotoxicity, correlationship.

화장품 산업은 인류문명의 발전과 더불어 성장하여 왔으며 국내 화장품 시장의 규모도 해마다 증가하고 있는 고부가가치 산업이다. 최근 기능성화장품이라는 새로운 용어를 도입되어 피부의 미백에 도움을 주는 제품, 피부주름개선에 도움을 주는 제품, 피부를 곱게 태워주거나 자외선으로부터 피부를 보호하는데 도움을 주는 제품으로 규정하고 이를 인정하고 있다.¹⁾ 기능성

화장품 중 주름방지용 화장품은 피부의 건강을 증진시키고 메력을 더하기 위하여 해마다 급성장하고 있다. 화장품의 원료는 제품 및 기원에 따라 다르며 사용자의 기호추세에 따라 새로운 화장품 원료 개발이 요구되고 있으며 피부주름개선을 위한 원료의 개발도 전세계적으로 이루어지고 있다. 화장품 원료에 대한 안전성 평가는 식품의약품안전청 예규로 하여 급성독성시험자료, 1차피부자극시험자료, 안점막자극 또는 기타점막자극시험자료, 피부감작성시험자료, 인체사용시험자료, 흡입독성시험자료(분무제의 분사원료에 한함), 광

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-380-1783 (팩스) 02-380-1786

독성시험자료 등의 자료를 검토하여 실시하고있다. 따라서 화장품법에서 새롭게 인정한 주름방지용 화장품의 안전성을 평가하기 위하여 어떠한 안전성 자료가 더 필요한지를 검토하고 기초자료를 확보하는 실험을 실시할 필요성이 있으며 이를 근간으로 하여 주름방지용 화장품에 대한 안전성 검토지침을 마련할 필요성이 절실히 요구되고있다. 한편 최근에 유럽 및 미국 등 선진국에서 동물 보호론자 및 유관단체들의 실험동물 사용에 대한 반대입장을 공공연하게 밝힘에 따라 동물 대체 시험법의 개발 필요성이 대두되었으며, 이에 따라 유럽연합(EU)은 이미 1993년에 화장품관련 규정²⁾을 개정하여 1998년 1월 1일부터 동물실험을 실시한 화장품의 판매금지하기로 하였으나 과학적인 대체시험방법의 개발이 늦어짐에 따라 1997년 EU 집행위원회는 다시 상기 화장품의 판매금지 기한을 2000년 6월 30일로 연기하였다.³⁾ 또한 *in vivo* 독성시험은 과다한 인력, 자원, 경비가 소요된다.⁴⁾ 따라서 화장품의 안전성 평가를 위한 세계적인 흐름에 동참하기 위하여 동물 실험에 대한 대체시험법의 개발이 절실히 필요하다. 그러나 우리나라에서는 아직 대체시험법 개발의 연구가 미흡하며, 주름방지용 화장품의 안전성평가를 위한 대체시험법 연구가 아직 이루어지지 않았다. 본 연구에서는 주름방지용 화장품의 원료로 쓰이는 물질에 대한 안전성 평가안을 제시하기 위하여 *in vivo* 실험으로 피부자극 시험과 *in vitro* 실험으로 HaCaT cell을 이용한 MTT assay 시험을 실시한 후, 주름방지용 화장품 원료의 피부자극과 *in vitro* MTT assay와의 상관관계를 규명하고자 한다.

실험방법

시험물질 - Retinol은 retinol 10 C(BASF, Germany)을 사용하였고, all *trans*-retinoic acid와 glycolic acid는 Sigma(USA) 제품을 사용하였다. Ascorbic acid는 Roche(Switzerland), ethanol:butylene glycol(2:8, EB)에 사용되는 ethanol은 Sigma, butylene glycol은 Aldrich사 제품을 사용하였다. Ginseng extract는 한 국담배인삼공사에서 제공받았다.

세포배양 - Human immortalized keratinocyte (HaCaT) cells은 독일 암연구센터(German Cancer Research Center, Division of Differentiation and Carcinogenesis *In vitro*)의 Dr. Fusenig로부터 얻어

서 사용하였다. HaCaT cell은 사람의 정상피부에서 얻은 각질세포(keratinocyte)와 SV40과 융합하여 얻은 세포주로서 사멸되지 않는 정상(immortalized)을 갖고 있으며, 본 실험에서는 HaCaT cell을 nutrient mixture F-12, sodium bicarbonate, penicillin-streptomycin, 5% fetal bovine serum이 보충된 DMEM에서 배양하였다.

***In vitro* cytotoxicity assay (MTT reduction test)** - MTT[3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetra-zoliumbromide]는 세포 내로 흡수된 후, 미토콘드리아의 succinate dehydrogenase에 의해 formazan을 형성하는데 이 물질의 세포내 축적은 미토콘드리아의 활성, 넓게는 세포의 활성을 의미하므로 세포의 생존율을 측정하는 방법⁵⁾으로 이용되고 있다. 96 well plate에 1×10^5 cells/ml의 세포를 새로운 배지를 200 μ l씩 넣어 37°C, 5% CO₂ incubator에서 하루정도 배양한 후 시험물질을 처리하여 3시간, 24시간, 48시간, 72시간을 배양하였다. 세척한 각 well에 200 μ l씩 넣어 주고 MTT (Sigma Co.)를 2 mg/ml의 농도로 준비하여 50 μ l씩 첨가한 후 3시간 반응을 시켰다. 각 well 당 시험물질 220 μ l를 제거하고 보라색물질 30 μ l만 남긴 후 DMSO를 150 μ l 첨가하여 microplate mixer 상에서 10분간 잘 혼합하여 침전물을 용해시킨 후, 96 well plate ELISA reader에서 540 nm 흡광도로 O.D. (optical density) 값을 측정하였다. 모든 시험결과는 세포를 배양하지 않은 대조 well에서 측정된 흡광도에 대하여 보정한 값을 산출하였다.

실험동물 - 피부자극시험용으로 2.5~3.0 kg의 New Zeland white계 토끼를 분양 받아 1주일간 순화기간을 두었다. 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였으며 온도 23±2°C, 습도 55±10%, 12시간 명암주기의 사육 조건을 유지하였다.

피부자극시험 - 피부자극시험은 OECD 기준⁶⁾에 맞추어 all *trans*-retinoic acid, retinol, ascorbic acid, ginseng extract, glycolic acid, ethanol:butylene glycol(2:8)를 사용하여 홍반, 가피 및 부종 등을 국립독성연구소 표준작업지침서⁷⁾에 의해 관찰하였으며 피부일차 자극표에 의해 1주간 관찰하였다. 피부자극 시험의 경우는 도포 24시간 전에 제모를 하여 제모에 의한 피부자극을 안정화시킨 후, 찰과 피부 2개소와 비찰과 피부 2개소를 두어 찰과 피부 1개소와 비찰과 피부 1개소에 각각의 시험물질을 0.5 ml씩 도포하였다. 각각 30분, 1시간, 1일, 2일, 3일, 7일에 대조군과 비

교하여 관찰하였다.

상관관계 분석 - 시험물질의 세포독성 시험결과를 세포의 성장을 50%(20%, 80%) 감소시키는 농도인 IC_{50} (IC_{20} , IC_{80})으로 표시하여 평균값±표준차(오차)로 나타내었으며 그 값은 Litchfield & Wilcoxon⁸⁾의 방법으로 계산하였다. *In vitro* 시험결과로 IC_{50} (IC_{20} , IC_{80}) 값과 *in vivo* 시험결과로 피부자극도를 계산한 후, *in vitro* 시험은 세포독성이 높은 순으로 순위(rank)를 정하고, *in vivo* 시험도 피부자극이 높은 순으로 순위(rank)를 정하여 이들의 상관관계를 Spearman's rank

correlation analysis로 분석하였다.

실험결과

In vitro 세포독성

주름방지용 물질인 all *trans*-retinoic acid, retinol, ascorbic acid, ginseng extract, glycolic acid, ethanol : butylene glycol(2 : 8)을 HaCaT cell에 3시간, 24시간, 48시간, 72시간 동안 처리한 후 MTT reduction test를 이용하여 세포내의 mitochondrial succinate

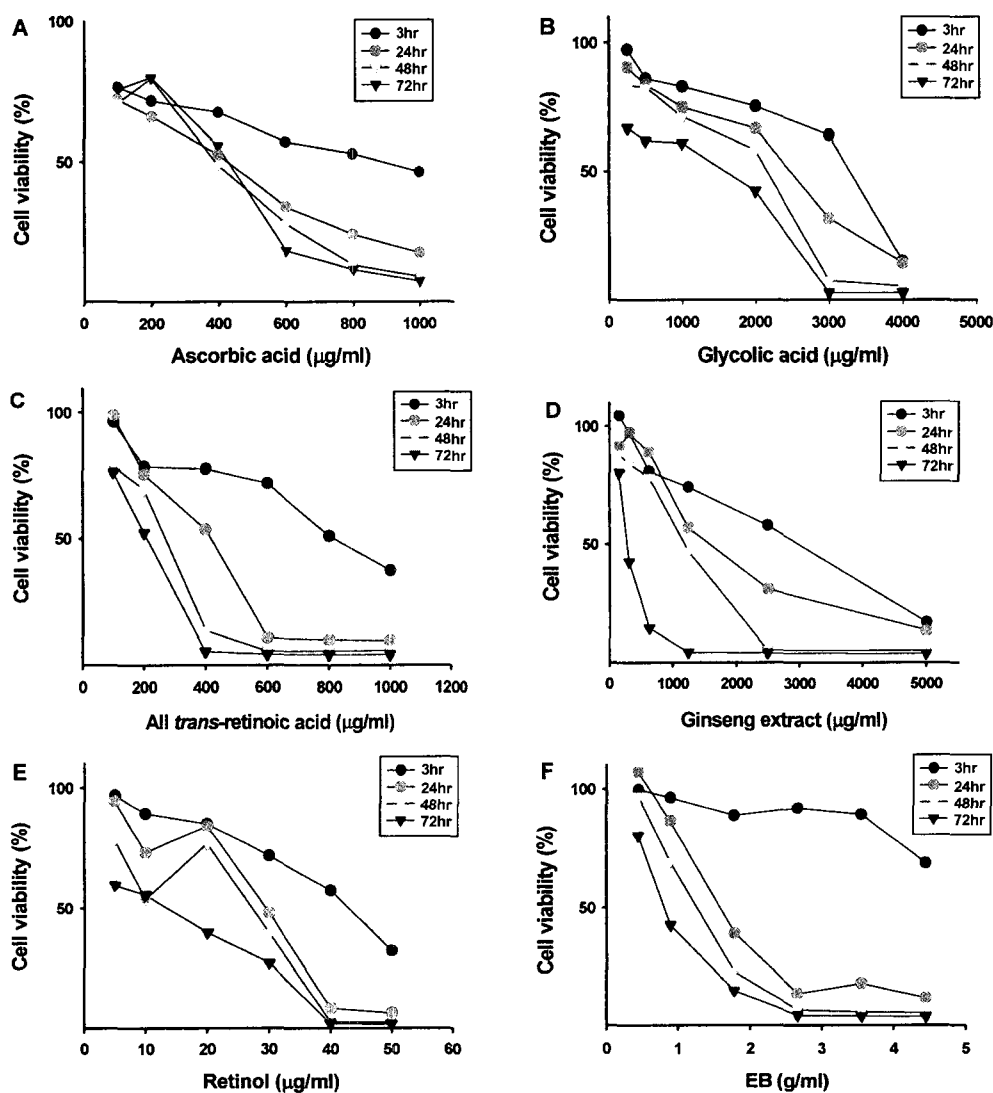


Fig. 1 - Cytotoxicity of anti-wrinkle agents in HaCaT cells. cell cytotoxicity was assessed by the MTT assay at the different time point.

dehydrogenase 효소 활성을 측정하여 세포 독성을 비교하였다. 6개의 시험물질 모두 농도가 높아짐에 따라 세포독성이 용량의존적으로 증가하였고 노출시간의 변화에 따른 세포독성을 살펴보면 노출시간이 증가함에 따라 세포독성이 증가하는 경향을 나타내었다. 또한 각 시험물질을 3시간 노출시켰을 때는 낮은 세포독성을 나타내었지만 24시간, 48시간, 72시간에서는 3시간에 서와는 달리 비슷한 세포독성을 나타내었다(Fig. 1). Ascorbic acid는 3시간째에서 MTT assay 결과 IC₅₀가 999.1 µg/ml 정도였으나 24시간 후에는 310.8 µg/ml, 48시간에서는 294.4 µg/ml로 나타나 24시간 후에는 세포독성이 별 차이가 없었다(Fig. 1A). Glycolic acid는 3시간에서 IC₅₀가 2,720 µg/ml이었고, 24시간에서는 1,787 µg/ml, 48시간에서는 1,127.5 µg/ml, 72시간에서는 683.1 µg/ml로 다른 ascorbic acid나 all trans-retinoic acid와 달리 노출시간에 따라 세포독성이 증가하였고, 또한 낮은 세포독성을 나타내었다(Fig. 1B). All trans-retinoic acid는 ascorbic acid와 유사하게 3시간째에서는 IC₅₀가 857.5 µg/ml이었고, 24시간째에서는 378.9 µg/ml, 48시간과 72시간에서는 각각 219.4 µg/ml와 171.6 µg/ml를 나타내어 24시간 노출 후에는 큰 차이가 없었다(Fig. 1C). Ginseng extract는 3시간에서 IC₅₀가 2,238.6 µg/ml, 24시간에서 1,616.4

µg/ml, 48시간과 72시간에서는 각각 805.7 µg/ml, 288.7 µg/ml로 노출시간에 길어질 때 세포독성이 증가하였고, 3시간일 경우의 IC₅₀값에 비해 24시간의 IC₅₀은 28%, 24시간에 비해 48시간은 50%정도 감소하였고, 마찬가지로 48시간과 72시간사이에서는 64.2%정도로 세포독성이 증가함을 나타냈다(Fig. 1D). Retinol은 all trans-retinoic acid와 ascorbic acid, EB와 유사하게 IC₈₀값이 24시간, 48시간, 72시간에서 큰 차이가 없었다(Fig. 1E). EB는 ethanol과 butylene glycol의 2:8 혼합물로서 가장 낮은 세포독성을 나타냈으며 24시간 노출 후에 세포독성의 차이가 없었다(Fig. 1F).

각 시험물질을 3시간 노출시켜 MTT reduction test 결과 retinol이 가장 높은 세포독성을 나타내고 있고, all trans-retinoic acid, ascorbic acid, ginseng extract, glycolic acid, EB 순이었다. 24시간을 노출시킨 결과는 마찬가지로 retinol이 가장 높은 세포독성을 나타내었고, ascorbic acid, all trans-retinoic acid, ginseng extract, glycolic acid, EB 순서를 나타내었다. 48시간과 72시간에서 모두 retinol이 가장 높은 세포독성을 나타내었고, 가장 낮은 세포독성을 나타낸 것은 EB물질이었다. 또한 HaCaT cell에 대하여 IC₅₀ 값을 산출한 결과 3시간 노출된 경우에 retinol이

Table I - *In vitro* cytotoxicity of anti-wrinkle agents exposed for 3h in human keratinocyte (HaCaT) cells (µg/ml)

Agents	IC ₂₀	IC ₅₀	IC ₈₀	Rank (by IC ₅₀)
Ascorbic acid	86.9	991.7	11313.1	3
Glycolic acid	962.1	2720.0	7687.4	5
All trans-retinoic acid	293.1	857.5	2508.3	2
Ginseng	903.0	2238.6	5549.3	4
Retinol	17.8	45.6	116.7	1
EB	3.9 × 10 ⁶	1.1 × 10 ⁷	2.9 × 10 ⁷	6

EB (ethanol : butylene glycol=2 : 8)

Table II - *In vitro* cytotoxicity of anti-wrinkle agents exposed for 24h in human keratinocyte (HaCaT) cells (µg/ml)

Agents	IC ₂₀	IC ₅₀	IC ₈₀	Rank (by IC ₅₀)
Ascorbic acid	89.2	310.8	1083.5	2
Glycolic acid	603.1	1787.2	5296.0	5
All trans-retinoic acid	228.5	378.9	662.8	3
Ginseng	594.2	1616.4	4396.9	4
Retinol	10.7	20.5	39.3	1
EB	9.7 × 10 ⁵	1.8 × 10 ⁶	3.3 × 10 ⁶	6

EB (ethanol : butylene glycol=2:8)

Table III – *In vitro* cytotoxicity of anti-wrinkle agents exposed for 48h in human keratinocyte (HaCaT) cells ($\mu\text{g/ml}$)

Agents	IC ₂₀	IC ₅₀	IC ₈₀	Rank (by IC ₅₀)
Ascorbic acid	117.6	291.6	723.5	3
Glycolic acid	468.3	1127.5	2714.6	5
All <i>trans</i> -retinoic acid	107.0	219.4	449.8	2
Ginseng	337.6	805.7	1923.0	4
Retinol	6.5	13.6	28.6	1
EB	7.6×10^5	1.3×10^6	2.1×10^6	6

EB (ethanol : butylene glycol=2:8)

Table IV – *In vitro* cytotoxicity of anti-wrinkle agents exposed for 72h in human keratinocyte (HaCaT) cells ($\mu\text{g/ml}$)

Agents	IC ₂₀	IC ₅₀	IC ₈₀	Rank (by IC ₅₀)
Ascorbic acid	132.5	294.4	654.0	4
Glycolic acid	263.3	683.1	1771.8	5
all <i>trans</i> -retinoic acid	83.5	171.6	352.8	2
Ginseng	146.1	288.7	570.4	3
Retinol	4.3	9.5	21.1	1
EB	3.98×10^5	8.04×10^5	1.62×10^6	6

45.6 $\mu\text{g/ml}$ 으로 가장 높은 세포독성을 나타내었고, EB가 $1.06 \times 10^7 \mu\text{g/ml}$ 으로 가장 낮은 세포독성을 나타내었다. 24시간 노출경우와 48시간 노출 경우, 72시간 노출경우에도 마찬가지로 가장 높은 세포독성물질과 가장 낮은 세포독성물질의 순위는 같게 나타내었다 (Table I-IV).

In vivo 피부자극

6종의 주름방지제에 대하여 *in vivo* 시험인 피부자극시험을 실시한 결과를 Table V에 나타내었다. 각 시험물질을 0.5 ml 처리하여 30분, 1시간, 24시간, 48시간, 72시간, 7일동안 관찰한 결과 glycolic acid와 EB가 0으로 가장 낮은 피부자극을 나타내었고, all *trans*-retinoic acid가 0.92로 가장 높은 피부자극성이 있었으며, 피부를 관찰하였을 때 약간의 발적과 부종이 관찰되었으며, ascorbic acid, retinol, ginseng extract의 순서로 피부자극성을 나타내었다. All *trans*-retinoic acid와 ascorbic acid는 약한 자극성을 나타내었으며, retinol과 glycolic acid, ginseng extract, EB는 자극성이 없음을 알 수 있었다(Table V).

*In vitro*와 *In vivo* 시험의 상관관계

MTT assay를 이용한 *in vitro* 시험결과와 *in vivo* 인 피부자극시험 결과의 수치와 rank를 제시하였다

(Table VII). 그 결과로 *in vitro* 시험결과와 *in vivo* 시험결과와의 상관관계를 Spearman's rank correlation 방법으로 분석하여, 노출시간별로 시험물질에 대한 순위를 그래프로 나타내었다(Fig. 2). *In vitro* 시험은 IC₅₀에 의한 결과를 기준으로 비교하였으며 IC₂₀, IC₈₀와 비교 평가를 함께 실시하였다. HaCaT을 이용한 MTT assay(IC₅₀ 기준)와 토끼를 이용한 피부자극시험과의 상관관계는 3시간 노출시켰을 때의 경우 Fig. 2에서 보는 바와 같이 $r=0.814$ 로 나타났다. 24시간 노출경우에는 $r=0.757$ 로 3시간 보다 낮은 correlation을 나타내었다. 48시간 노출 경우에는 3시간 노출경우와 동일하게 $r=0.814$ 를 나타내었고, 72시간 노출경우에 $r=0.700$ 로 가장 낮은 correlation을 나타내었다. IC₂₀ 및 IC₈₀에 의한 MTT와 *in vivo*와의 상관관계는 Table VI, VIII에 나타내었다. IC₂₀ 및 IC₈₀와 *in vivo* 결과와의 상관관계도 IC₅₀치의 경우와 유사함이 관찰되었다.

고 찰

최근 몇년동안 국내에서도 피부주름관련 기초연구, 주름발생 기전연구 및 주름방지 물질의 개발이 되고있으나, 현재까지 개발된 성분 및 원료들을 객관적이며 정확한 방법을 이용하여 그 기능성 및 안전성을 평가

Table V – Results of skin irritation test treated with 6 anti-wrinkle agents

Test Material	Scoring Time	Erythema		Oedema		Average Score	P.I.I	Rating
		Intact	Abraded	Intact	Abraded			
Ascorbic acid	30 min	1/0/1	0/0/1	0/0/0	0/0/0	1	0.83	slight-irritant
	1 hr	1/0/1	0/0/1	0/0/0	0/0/0	1		
	24 hr	1/0/1	0/0/1	0/0/0	0/0/0	1		
	48 hr	1/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0.33		
	72 hr	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0		
	7 day	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0		
Glycolic acid	30 min	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0	0	non-irritant
	1 hr	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0		
	24 hr	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0		
	48 hr	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0		
	72 hr	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0		
	7 day	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0		
All <i>trans</i> -retinoic acid	30 min	2/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0.67	0.92	slight-irritant
	1 hr	2/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0.67		
	24 hr	2/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0.67		
	48 hr	2/0/0	1/1/0	0/0/0	0/0/0	1.34		
	72 hr	1/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0.33		
	7 day	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0		
Retinol	30 min	1/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0.33	0.42	non-irritant
	1 hr	1/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0.33		
	24 hr	1/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0.33		
	48 hr	1/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0.33		
	72 hr	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0.33		
	7 day	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0		
Ginsung	30 min	0/0/0	0/1/0	0/0/0	0/0/0	0.33	0.25	non-irritant
	1 hr	0/0/0	0/1/0	0/0/0	0/0/0	0.33		
	24 hr	0/0/0	0/1/0	0/0/0	0/0/0	0.33		
	48 hr	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0		
	72 hr	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0		
	7 day	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0		
EB	30 min	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0	0	non-irritant
	1 hr	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0		
	24 hr	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0		
	48 hr	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0		
	72 hr	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0		
	7 day	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0		

EB(ethanol : butylene glycol=2:8)

할 수 있는 평가법이 개발되어 있지 않은 실정이다. 현재 화장품 원료에 대한 안전성 평가는 식품의약품안전청 예규로 하여 급성독성시험자료, 1차피부자극시험자료, 안점막자극 또는 기타점막자극시험자료, 피부감작성시험자료, 인체사용시험자료, 흡입독성시험자료(분무제의 분사원료에 한함), 광독성시험자료 등의 자료

를 검토하여 실시하고 있다. 따라서 화장품법에서 새롭게 인정한 주름방지용 화장품의 안전성을 평가하기 위하여 어떠한 안전성 자료가 필요한지를 검토하고 기초자료를 확보하는 실험을 실시할 필요성이 있으며 이를 근간으로 하여 주름방지용 화장품에 대한 안전성 검토지침을 확립할 필요성이 있다.

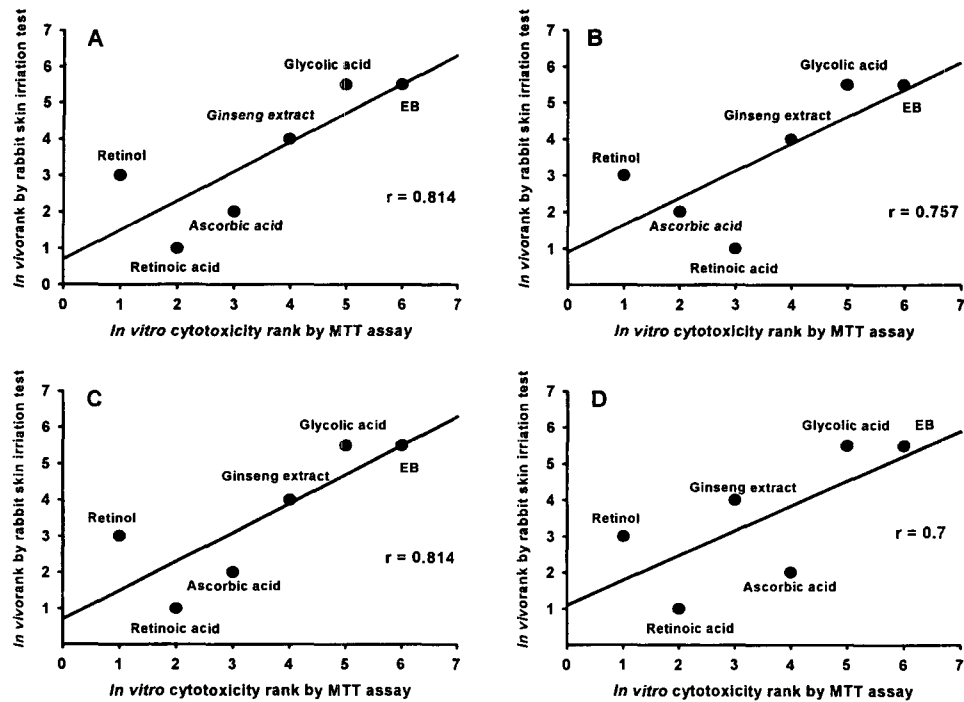


Fig. 2 – Correlation between *in vitro* cytotoxicity rank by MTT assay using HaCaT cells and *in vivo* skin irritation rank by rabbit skin irritation test (A, 3h; B, 24h; C, 48h; D, 72h exposure)

Table VI - Comparison of the cytotoxicity and skin irritation potentials of anti-wrinkle agents

Chemicals	MTT (IC ₂₀)				Rabbit skin irritation test	
	3 hr	24 hr	48 hr	72 hr	PI.I.	Rank
Ascorbic acid	86.9	89.2	117.6	132.5	0.83	2
Glycolic acid	962.1	603.1	468.3	263.3	0.00	5.5
All <i>trans</i> -retinoic acid	293.1	228.5	107.0	83.5	0.92	1
Ginseng	903.0	594.2	337.6	146.1	0.25	4
Retinol	17.8	10.7	6.5	4.3	0.42	3
EB	3.9×10^6	9.7×10^5	7.6×10^5	4.0×10^5	0.00	5.5

EB (ethanol : butylene glycol=2:8)

Table VII – Comparison of the cytotoxicity and skin irritation potentials of anti-wrinkle agents

Chemicals	MTT (IC ₅₀)				Rabbit skin irritation test	
	3 hr	24 hr	48 hr	72 hr	PI.I.	Rank
Ascorbic acid	991.7	310.8	291.6	294.4	0.83	2
Glycolic acid	2720.0	1787.2	1127.5	683.1	0.00	5.5
All <i>trans</i> -retinoic acid	857.5	378.9	219.4	171.6	0.92	1
Ginseng	2238.6	1616.4	805.7	288.7	0.25	4
Retinol	45.6	20.5	13.6	9.5	0.42	3
EB	1.06×10^7	1.78×10^6	1.2810^6	8.0×10^5	0.00	5.5

EB (ethanol : butylene glycol=2:8)

Table VIII – Comparison of the cytotoxicity and skin irritation potentials of anti-wrinkle agents

Chemicals	MTT (IC ₈₀)				Rabbit skin irritation test	
	3 hr	24 hr	48 hr	72 hr	PII.	Rank
Ascorbic acid	1131.3	1083.5	723.5	654.0	0.83	2
Glycolic acid	7687.4	5296.0	2714.6	1771.8	0.00	5.5
All <i>trans</i> -retinoic acid	2508.3	662.8	449.8	352.8	0.92	1
Ginseng	5549.3	4396.9	1923.0	570.4	0.25	4
Retinol	116.7	39.3	28.6	21.1	0.42	3
EB	2.89 × 10 ⁷	3.3 × 10 ⁶	2.17 × 10 ⁶	1.62 × 10 ⁶	0.00	5.5

EB (ethanol : butylene glycol=2:8)

또한 최근에 유럽 및 미국 등 선진국에서 동물 보호론자 및 유관단체들의 실험동물사용에 대한 반대입장을 공공연하게 밝힘에 따라 동물대체시험법의 개발 필요성이 대두되었으며 화장품의 안전성 평가를 위한 세계적인 흐름에 동참할 필요성이 있으므로 동물실험에 대한 대체시험법의 개발이 절실한 실정이어서 대체시험법에 대한 기초자료 확보실험이 필요하다. *In vitro* 대체 시험법은 영국의 FRAME(Fund for the replacement of animals in medical experiment), 유럽의 ECVAM(European center for the validation of alternative methods), 미국의 CAAT(John Hopkins center for alternatives to animal testing), 일본의 JASSE(Japanese society of alternatives to animal experiment)등에서 시험 및 validation 연구, 교육등을 실시하며 주도하고 있다.^{4,9)} EC/HO(European commission/British home office)에서는 우선적으로 안점막 자극 시험에 대하여 대체시험법을 개발하고자 유럽, 미국, 일본의 연구기관과 함께 red blood cell hemolysis test, EYTEX method, bovine corneal opacity/permeability test, HET-CAM(hen's egg chorioallantoic membrane) test, fluorescein leakage test, Isolated chicken eye test, Silicon microphysiometer test, neutral red uptake 등을 실시하고 validation 연구를 실시하였다.^{4,10)} 그 결과 *in vivo*와의 상관관계가 높은 것으로 파악되었으며 안자극시험은 *in vitro* 대체 가능성이 있는 것으로 평가하였다. 이렇게 안점막자극시험이 validation 수준까지 와있는 반면 피부자극시험에 대한 연구는 느리게 진행되고 있다. *In vitro* 피부자극 시험 대체시험법으로 arachidonic acid release 측정¹¹⁾과 Muller-Decker 등¹²⁾은 MTT 시험, IL-1 α 측정이 피부자극시험에 대한 대체가능성이 있다고 보고하였으며, Shin 등¹³⁾은 LDH와 MTT 방법이 피부자극시험

대체시험법으로의 가능성에 대하여 보고하였다. 또한 R. Osborne¹⁴⁾는 neural red, MTT assay, lactate dehydrogenase, N-acetyl glucosamidase release, glucose utilization을 이용한 세포독성과 염증지표인 prostaglandin E2 release를 측정하여 human skin cell model이 전임상적 피부자극 평가에 유용하다고 제시하였다.

본 시험에서는 피부자극시험과 그 대체시험법으로 가능성이 높으며 재현성이 있는 MTT방법을 이용하여 6종의 주름방지용 화장품의 원료를 대상으로 사람의 keratinocyte와 SV40을 융합시켜 immortalized시킨 HaCaT cell¹⁵⁾을 이용하여 실험하였다. 실험결과 *in vivo* 피부자극시험에서는 6가지 물질 중 all *trans*-retinoic acid가 P.II=0.92로서 가장 높은 자극성을 나타내었고, 다음순위로는 ascorbic acid가 P.II=0.83으로 자극성을 나타냈으며 이들 모두 약한 자극성으로 판정되었다. Glycolic acid는 다른 acid인 all *trans*-retinoic acid와 ascorbic acid와는 다르게 피부자극성이 나타나지 않았고, retinol, ginseng extract, EB 같이 비자극성으로 판정되었다. *In vitro* MTT실험결과 6가지 시험물질 모두 농도가 높아짐에 따라 세포독성이 용량의존적으로 증가하였고, 노출시간의 변화에 따른 세포독성을 살펴보면 노출시간이 증가함에 따라 세포독성이 증가하는 경향을 알 수 있다. 6가지 시험물질중 각 노출시간 모두에서 retinol이 가장 높은 세포독성을 나타냈고, EB가 가장 낮은 세포독성을 나타냈다. 6가지 물질의 세포독성을 3시간, 24시간, 48시간, 72시간 측정된 결과 3시간째 세포독성만 낮게 나타났고, 24시간, 48시간, 72시간이 유사한 정도를 나타냈고, 시간에 따른 물질간의 순위가 변하지 않았으므로 24시간째의 세포독성을 측정하는 것이 적절하다고 생각된다. *In vivo* 피부자극시험과 *in vitro* MTT

(IC₅₀ 기준) 실험결과와 노출시간에 따른 상관지수를 살펴보면 3시간에서 $r=0.814$, 24시간에서는 $r=0.757$, 48시간 $r=0.814$, 72시간에서 $r=0.700$ 로 나타나 대체로 높은 상관관계를 보였다. 주름방지용 화장품원료를 대상으로 HaCaT cell을 이용한 MTT 실험에서 시험물질을 3시간 노출시 IC₅₀을 기준으로 하였을 때 상관지수가 0.814로 나타났고 IC₂₀을 기준으로 하였을 때는 0.757이었다. 24시간을 노출시켰을 때는 IC₅₀과 IC₂₀에서 0.757로 같은 값을 나타내었다. 이것은 용해도가 낮은 시험물질일 경우에는 IC₂₀값을 구하여 세포독성과 *in vivo*와의 상관성을 파악할 수 있다는 것을 시사한다. LEE 등¹⁶⁾의 연구에서도 용해도가 낮은 시험물질에서 IC₅₀을 구하기 힘든 경우 IC₁₀을 기준으로 세포독성 및 *in vivo*와의 상관성을 파악할 수 있다고 보고하였다.

이상의 결과 주름방지용 화장품에 대하여 피부자극 시험을 실시한 결과 피부자극시험은 *In vitro* 대체시험법으로 개발이 가능하며 HaCaT cell을 이용한 MTT 시험방법이 가능성이 높고 앞으로도 계속하여 validation화 할 수 있는 연구가 필요하다고 생각된다.

결 론

주름방지용 화장품 물질인 ascorbic acid, glycolic acid, retinoic acid, ginseng extract, retinol, EB를 피부자극 시험과 세포독성시험을 실시하여 상관관계를 살펴보았다. 세포독성시험은 3시간, 24시간, 48시간, 72시간동안 처리한 결과 농도와 처리시간의 용량의존적으로 독성이 증가하였다. 피부자극시험에서는 대부분 자극성이 없었고, retinoic acid의 피부자극도가 0.92로 가장 높았다. 세포독성시험에서는 retinol이 가장 높은 세포독성을 나타내었다. Spearman's rank correlation analysis를 이용하여 피부자극과 세포독성(IC₅₀)의 상관관계를 분석하였다. 주름방지용 화장품 물질을 3시간, 24시간, 48시간, 72시간 노출시켰을 때 상관계수가 각각 0.814, 0.757, 0.814와 0.700이었고, IC₂₀와 IC₈₀값을 기준하였을 때에도 상관지수가 비슷하였다. 본 연구에서 주름방지용 화장품 물질의 피부자극 대체시험법으로 시험물질을 단시간 노출시켰을 때 IC₅₀을 기준한 세포독성시험과 용해도가 낮은 시험물질에서는 IC₂₀을 기준한 세포독성시험이 가능하다고 생각된다.

감사의 말씀

본 연구는 보건복지부 정책연구개발사업에 의하여 지원되었으며 이에 감사드립니다(HMP-00-P-21900-0021).

문 헌

- 1) 식품의약품안전청 고시 제6025호(화장품법기준 : 2000. 1. 12).
- 2) Council directive. The european cosmetic directive (76/768/EEC) (1993).
- 3) Commission of the European communities, 1996 commission report on the development validation and legal acceptance of alternative methods to animal experiments in the field of cosmetics. Com(97). 182. final. Brussels, 5. 5 (1997).
- 4) Clothier R. H., Atkinson, K. A., Garle, M. J., Ward, R. K. and Willshaw, A. : The development and evaluation of *In vitro* tests by the frame alternatives laboratory. *ATLA*, **23**, 75 (1995).
- 5) Roehm N. W., Rodgers G. H., Hatfield S. M. and Glasebrook A. L. : An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J. Immunol. Methods*. **142**, 257(1991).
- 6) OECD, OECD Guidelines for the testing of chemicals 404, 405, OECD Publications service, Paris (2000).
- 7) 식약청 국립독성연구소 : 독성·약리·병리 표준작업지침서, 국립독성연구소, p. 493 (1999).
- 8) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F. : A simplified method of evaluating dose effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **96**, 99 (1949).
- 9) Marafante, E., Smyrniotis, T. and Balls, M. : ECVAM: The european center for the validation of alternative methods. *Toxic In vitro*. **8**, 803 (1994).
- 10) Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. and Spielmann, H. : The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxic. In vitro*. **9**(6), 871 (1995).
- 11) Deleo, V. A. M. P. Carver, J. Hong, K. Fung, B. Kong and S. Desalva. : Arachidonic acid release: as *In Vitro* Alternative for Dermal Irritancy Testing. *Fd Chem. Toxic.* **34**(2), 167 (1996).
- 12) Muller-Decker, K., Furstemberger, G. and Marks F. :

- Keratinocyte-derived proinflammatory key mediators and cell viability as in vitro parameters of irritancy: A possible alternative to the Draize skin irritation test. *Toxicol. & Appl. Pharmacol.* **127**, 99 (1994).
- 13) Shin, D. S., Kim, D. B., Ryu, S. R., Lee, S. H., Kim, P. Y. Koh, J. S. and Park, W. J. : *In vitro* alternatives to skin-irritation tests. *Cosmetics & Toiletries*. **111**, 61 (1996).
- 14) Osborne R. and Perkins M. A. : An Approach for development of alternative test methods based on mechanisms of skin Irritation. *Fd Chem. Toxic.* **32**(2), 133 (1994).
- 15) Petra Boukamp, Rule T. Petrussevska, Dirk Breitreutz, Jurgen Hornung, Alex Markham, and Norbert E. Fusenig. : Normal Keratinization in a Spontaneously immortalized Aneuploid Human Keratinocyte Cell Line. *J. Cell Biol.* **106**, 761 (1988).
- 16) Jong Kwon Lee, Dai byung Kim, Eun Hee Lee, Sun Hee Lee, Seung Rel Ryu, Ki Hwan Choi, Yoon Jeong Kim and Pu Young Kim. : *In Vitro* Skin Irritation Test of Anti-inflammatory Drugs. *J. Toxicol. Pub. Health.* **14**(3), 315 (1998).