

배양된 인공피부와 인공각막 등 인체조직을 이용한 화장품원료의 안전성 및 효능평가 기술

양은경, 고강일, 김성포, 이종원¹, 박정극¹, 김기호

(주)바이오랜드 생명공학연구소 / 330-860 충남 천안시 병천면 송정리 39-4.

동국대학교 화학공학과¹ / 100-715 서울 중구 필동 3가 26.

Safety & Efficacy Testing of Cosmetic Ingredients using Cultured Human Skin / Cornea Tissue Model

Eun Kyung Yang, Kang Il Ko, Sung Po Kim, Jong Won Lee¹, Jung Keug Park¹ and Ki Ho Kim

R&D Center, BIOLAND Ltd., ByongChon, ChonAn, ChungNam, 330-860, Korea

Dept. of Chemical Engineering, Dongguk University¹, Seoul 100-715, Korea

1. 동물대체시험법 (Alternatives to Animal Testing)

제약, 화장품 및 여러 화학원료 산업에 있어서 신원료의 개발 시에 그 안전성과 효능을 입증하기 위하여 신원료의 스크리닝 단계에서부터 많은 동물시험이 수행되고 있다. 그러나 시험동물의 수를 최소화하자는 국제사회 요구의 중요성이 대두되면서, 새로운 생명공학 기술 중 조직공학 기술(Tissue Engineering)을 이용한 여러 화학원료의 동물대체시험법이 개발되고 있다. 다국적 제약회사인 P & G 제약(Procter & Gamble Pharmaceuticals, Ohio, USA)의 설명을 인용하면, 약물의 독성을 예측하기 위한 시험에서 과거와 같이 동물을 그대로 사용하여 최대 독성의 dose 까지 동물에게 투여하여 검사하던

전통적인 방식은 최근 더 이상 사용할 수 없게 되었다고 주장하였다(Toxicology for the Next Millenium, Annals of the New York academy of science, Vol. 919, 2000).

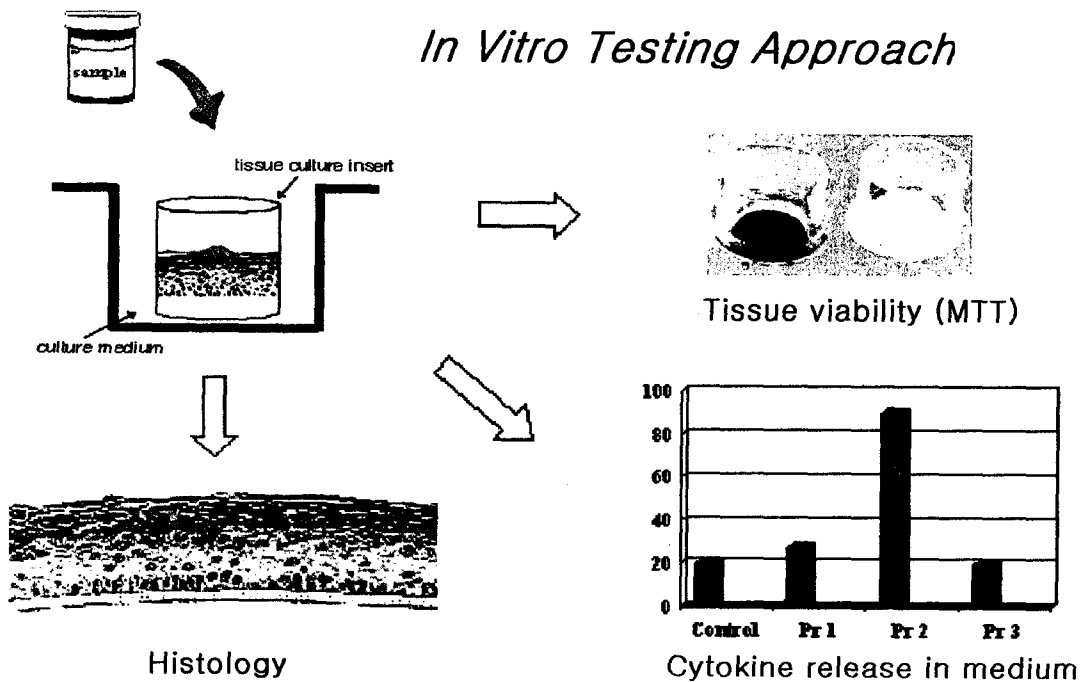
즉, 우선적으로 고려되는 것은 경제적인 요인으로, 개발초기 단계의 모든 화학물질에 대하여 대규모의 동물시험을 수행하는 것은 cost 와 timing 의 관점에서 그 비용이 낭비된다. 두 번째로는 독성물질의 안전성 평가에 실험동물을 사용하는 것에 관한 사회단체의 압력과 윤리규제 등 여러 금지조항 요구가 국제사회에서 증가하고 있다. 특히 사람의 생명과 직접적으로 관련되지 않는 화장품 및 기능성 첨가원료의 경우 시험동물 수를 최소화하자는 국제사회의 요구는 더욱 커지고 있다. 세 번째 요인은, 동물실험 결과에서 판별된 고농도의 독성물질의 지표를 인체에 대해 적용하는 것은 매우 부정확하다고 평가되고 있다. 이와 같은 요인에 따라 더욱 빠른 시간 안에, 저렴한 비용으로, 동물시험의 수를 최소화하고, 또한 인체의 약물에 대한 생체 반응에 동물을 사용한 것 보다 더 가깝게 예측할 수 있는 독성 및 효능시험 평가 방법의 개발에 대한 필요성이 날로 늘어나고 있다.

2. 배양된 인체조직을 이용한 화장품 원료의 안전성 및 효능평가 기술 (Safety & Efficacy Testing of Cosmetic Ingredients using Cultured Human Skin and Cornea Tissue Model)

최근 조직공학의 발달로 실험실에서 인체조직을 재구성할 수 있게 됨으로써 이러한 동물시험을 대체할 수 있는 인체의 조직모델을 실험실에서 제조하여 약물의 *in vitro* 시험에 이용하려는 시도가 활발히 이루어지고 있다. 조직공학이란, 질병이나 사고로 잃어버린 신체의 일부 장기(또는 조직)를 생체적합성 재료를 사용하여 원하는 기능과 구조를 가진 골격을 구성하고, 여기에 세포를 3 차원적으로 조직 배양하여 실제 인체와 같은 구조 및 기능을 가지는 살아있는 인공장기(또는 조직)를 개발하는 분야이다. 이러한

기술로 사람의 피부나 각막 등 인체조직모델(tissue model)을 제조하여, 동물에 시행되던 피부 도포시험과, 안 점막 시험을 대신하는 동물대체시험법으로 응용될 수 있다.

이러한 *in vitro* testing 시험법의 예는 GEN 뉴스지에 실린 다음 <그림 1>을 인용하여 설명할 수 있다(Genetic Engineering News, 2001/06/01). 먼저 그림과 같은 세포/조직배양 용기에 조직모델을 제조 배양한다. 그 제조된 조직 위에 독성시험이나 효능시험의 대상 신원료를 떨어뜨려 정해진 기간동안 계속해서 배양 한다. 이것을 일반적으로 조직검사와 세포생존도, 그리고 사이토카인의 분비량(IL-1 α , IL-6, IL-8, TNF- α , 등) 등을 분석함으로써 대상 시료의 자극시험을 할 수 있다.



<그림 1> 인체조직모델을 사용하여 약물의 안전성 시험에 적용하는 시험 예

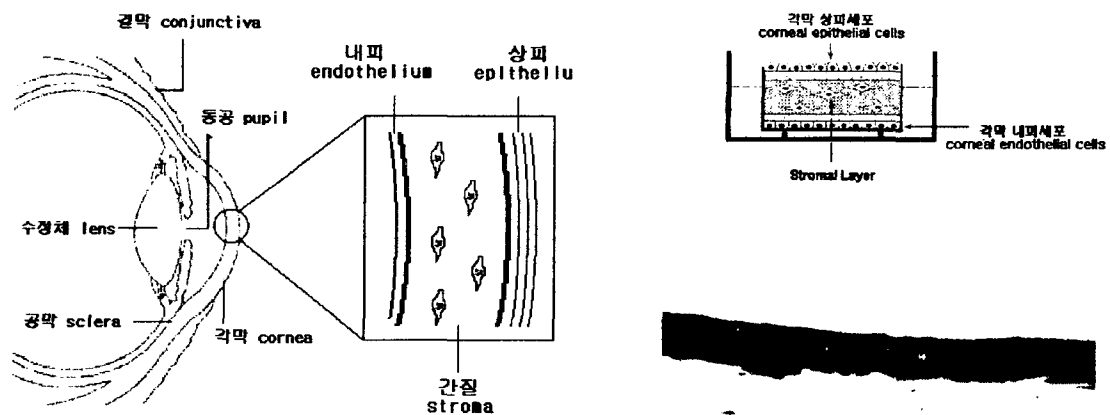
(Ref: Genetic Engineering News 2001.6.1.)

이와 같은 시험모델을 산업계에서 사용하기 위해서는 그 모델의 제조와 시험 protocol 의 validation 과 standardization 이 필요한데, 그 표준 규정을 마련하기 위한 노력들이 진행 중이다. 즉, 사람피부의 표피조직에 관하여 다음의 몇 가지 항목, 즉

생산된 표피조직의 두께, 중층화된 세포층의 개수, 총 배양 기간, 기존에 밝혀져 있는 자극성 화학 시약에 대한 감수성 정도 등과 같은 항목에 대하여 표준화를 시키는 노력들이 진행 중이다.

화장품 및 생활용품 등의 여러 원료에 대한 실제 시험 예로, 조직공학적으로 재구성한 인공피부등을 사용하여 피부 자극성, 염증 반응, 광 독성, 알레르기 반응 등의 시험을 다음과 같은 분석을 통하여 조사하고 있다. 즉, 인공피부의 조직 내 세포의 활성뿐 아니라 세포분비물질인 IL-1 α , TGF- β , TNF- α , IL-6, IL-8, PGE-2, 12-HETE 등의 cytokine 생성량 등을 지표로 할 수 있다. 또한 화장품의 효능 시험을 위해서는 배양된 인공피부를 이용하여 자외선 조사 후 생성된 멜라닌의 정량, 시험물질 처리 후 인공피부의 콜라겐과 엘라스틴의 정량 등의 방법을 통하여 신원료를 스크리닝하고 있다. 이밖에도 안구 자극 시험, 구강용 제품의 자극시험, 여성청결제의 독성시험, 경피 흡수 물질의 탐색, candida 와 같이 피부감염증의 원인이 되는 미생물의 표피 및 상피에의 감염 등의 *in vitro* 시험에 사용될 수 있다. 이러한 non-animal testing 의 사용은 직접, 간접적으로 비용을 낮추고 또한 제품의 질을 개선시키는데 서로 synergistic 한 효과가 있다고 하겠다.

안구자극시험을 위한 인공각막 조직을 실험실적으로 제작하는 방법은 다음 <그림 2>와 같이 설명할 수 있다. 즉 좌측 그림의 각막 조직을 3 차원적으로 배양하며, 이중 제품화된 것은 각막의 상피와 간질층을 제조한 것이다.



<그림 2> 안구자극 시험을 위한 인공각막 조직의 제조 방법

3. 해외 정책 현황

유럽연합(EU) 집행위원회는 화장품 안전성 검사를 위한 동물 실험을 전면 금지시키는 지침안을 2000년 4월 5일 채택했다. 이 지침은 제조된 화장품의 동물 실험을 EU 내에서 즉각적, 항구적으로 금지시키고 화장품 원료의 동물 실험은 지침이 회원국에서 발효된 지 3년 후부터 전면 금지시키도록 규정하고 있다. 현재 EU 내에서 화장품 및 원료 실험에 쓰이는 동물은 전체 실험용 동물의 0.3 퍼센트를 차지하고 있다. 그 밖의 해외 정책 현황으로 *in vitro* 시험 모델이 국제사회에서 각국의 여러 기관을 통하여 동물대체시험법에 관한 정책이 제시되었으며 다음과 같이 요약될 수 있다.

과거 경제 협력 개발 기구(OECD)는 약물 치사량 결정을 위해 200 마리의 동물시험 자료를 요구하였으나(OECD guideline 404, 1992), 현재에는 약물 치사량 결정을 위한 시험 동물 수를 18 마리로 제한하고 *in vitro* 시험법을 제시하고 추천하고 있는 실정이다(OECD Series on testing and assessment, No. 16, Detailed review document on classification systems for skin irritation/corrosion in OECDmember countries, 1999). 또한 안구 자극 및 부식성 검사를 위한 실험동물의 사용이 비윤리적이라하여 '*in vitro* 시험 결과를 기초로 예상되는 부식성 물성을 지닌 물질에 대해 *in vivo* 시험을 할 필요가 없다'라는 내용의 안내문이 작성되었다(급성피부 자극/부식에 대한 OECD 시험 안내문 404, 1992 ; 18th Amendment to Directive 67/548/EEC, 1993). 미국의 경우 ICCVAM(Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)의 주관하에서 동물시험법의 대체 시험법으로서 인공피부를 비롯한 대안을 제시하고 있다.

4. 해외 관련 산업체 동향

이와 같은 해외 정책 동향에 따라 인공피부를 동물대체시험법으로서 제작하여 산업화한 대표적 업체들을 소개하면 다음 <표 1>과 같다.

<표 1> 동물대체시험법을 위한 인공피부의 산업화 현황

산 업 체	상 품 및 내 용
Organogenesis Inc. (Canton, MA, USA)	TESTSKIN II ; toluene, triethanolamine 같이 피부 자극성이 있다고 알려진 물질들과 isostearyl alcohol, mineral oil 등과 같이 피부 비자극성으로 알려진 물질들의 EC ₅₀ 값을 MTT 전환율을 이용하여 측정, 실제 피부 값과 유사함을 증명.
Advanced Tissue Science (La Jolla, CA, USA)	Skin ² ™ ; UV-A,B(280-400 nm)를 조사하여 interleukin-1α(IL-1α)와 tumor necrosis factor-α(TNF-α)의 방출량을 검사
SkinEthic Laboratories (NICE, France)	4.0 cm ² 당 90 Euros 에 인공피부, 기타 인체 내 여러 상피조직의 제품화; 화장품이나, 의류 세제, 비누류, 연고 등의 약물에 대한 독성시험용으로 판매
MatTek (Ashland, MA, USA)	피부모델 EpiDerm, 각막모델 EpiOcular

위 <표 1>에서 소개된 회사 중 프랑스의 작은 회사 SkinEthic Laboratories 가 최근 Genetic Engineering News(2001/06/01, Mary Ann Liebert, Inc)의 「Corporate Profile」 난에 다음과 같이 소개되었다. 1992 년 Martin Rosdy 박사에 의하여 설립된 조직공학 기술을 응용하여 사람의 피부의 바깥층인 표피조직과 신체 여러 장기의 내외 표면을 덮고 있는 상피조직들을 제조하는 회사로서, 미국의 Johns hopkins University 에 위치한 동물대체시험법 센터(Center for Alternatives to Animal Testing)의 director 이자 SkinEthic Laboratories 사의 자문위원인 Alan Goldberg 는 이러한 사업화를 통하여 동물자체를 사용하지 않는 *in vitro* 시험법을 위하여 표준화된 배양 조직모델을 생산할 수 있게 되었으며, 이 생산제품은 안전성시험과 효능시험에 사용되던 동물의 수를 줄일 수 있도록 한다고 설명하였다. 동사는 GMP 표준규정에 의하여 생산되고 있는 인체조직 모델들을 전체의 약 50%이상 수출하고 있으며, 현재 생산고의 65%는 제약회사로 판매되고 있으며 20%가 화장품 회사, 15%가 여러 연구소에 판매되고 있는데, 주요

판매처로는 Henkel, Johnson & Johnson, Lancaster-Coty, LVMH, Novartis, SGS Biopharma, 3M, Pfizer, Unilever 등이다. 보존할 수 있는 유효기간이 24-48 시간으로, 유럽과 미국등지, 또는 아시아 지역에 배달되고 있으며, 2000 년 18,000 개의 표피조직을 생산하는 등 여러 가지 사람의 표피와 상피조직 판매로 같은해 총 130 만불의 판매고를 달성하였다. 또한 미국의 3M(St. Paul, MN)사의 John Butenhoff 는 이러한 생산품을 통하여 많은 동물과 사람의 사체피부를 줄일 수 있게 되었으며, 여러 연구개발제품에 피부자극시험과 피부투과도의 정량시험법에 사용하고 있다고 덧붙였다.

5. 국내 현황

최근 우리나라에서도 본고에서 소개된 인체 조직 모델을 이용하여 국내 현실에 적합한 평가법의 개발과 그 관리기준을 갖추기 위한 노력들이 일부 진행 중인 것으로 알고 있다. 즉, 국내에도 조직공학 관련 업체들이 여럿 생겨나고 있으며 그 중 인공피부를 환자에 대한 치료 목적 뿐 아니라 약물의 독성시험용으로도 활용하고자 시도하고 있다. 일례로 (주)바이오랜드는 조직공학기술을 이용한 인공피부와 인공각막을 개발중인 회사로, 자사의 화장품원료 등의 제품 수출 시에 인공피부를 이용한 피부자극시험과 항염증 데이터 자료를 제출하고 있으며, 또한 광 독성 및 여러 효능시험 그리고 인공각막 모델을 사용한 안점막 자극시험 등으로 응용범위를 넓히고 있다.

최근 생명공학의 급격한 발달로 인하여 이러한 독성 및 효능 평가법의 발달을 더욱 촉진하게 되었으며 앞으로 더욱 경제적이고 실현성이 높은 방법의 개발 개연성이 높아지고 있다. 즉, (1)분자생물학 기법의 발달로 약물의 독성 및 효능 지표물질을 분석하는데 실험 동물 전체의 반응에 필요한 대량의 약물 사용을 줄여 훨씬 소량 규모에서 세포 조직의 분자 단계에서 측정 가능하게 되었고 (2)조직배양 기술의 발달로 동물 전체의 대사 활성 시스템을 구현하는 더욱 우수한 생체 인공조직 모델이 개발될 것이다. 또한 (3)human genome analysis program 에 의하여 특정 유전자와 이로부터

조직공학적으로 제조된 특정 조직으로 인체의 조직반응을 예측할 수 있는 길이 열렸다고 하겠다.

이와 같이 앞으로 계속 개발의 여지를 남겨두고 있는 인공피부, 인공각막 등 여러 인체조직을 이용한 원료의 유효성 평가 방법에 대한 국내 기반기술을 축적하고 또한, 화장품과 약물 등의 동물대체시험법을 위한 연구 결과와 이를 이용한 안전성 및 효능 시험의 평가 결과의 데이터베이스를 축적시키고 관리함으로써, 인공피부와 인공각막 등 조직공학 관련 국내산업의 발달 뿐 아니라, 동물대체시험법을 요구하는 국제사회의 추세를 놓치지 않고 국내에서 제조되는 여러 원료의 해외 수출 촉진에도 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

1. Genetic Engineering News, Mary Ann Liebert, Inc. 「Corporate Profile」, 2001.06.01
2. Toxicology for the Next Millenium, Annals of the New York academy of science, 2000, Vol. 919
3. Gay R, Swiderek M, Nelson D, Ernesti A: The living skin equivalent as a model in vitro or ranking the toxic potential of dermal irritants. Toxicol In Vitro, 1992, Vol. 6:303-315
4. Bell E, Parenteau N, Gay R, Nolte C, Kemp P, Bilbo P, Ekstein B, Johnson E: The living skin equivalent: Its manufacture, its organotypic properties and its responses to irritants. Toxicol In Vitro, 1991, Vol. 5:591-596
5. Ponec M, Kempenaar J: Use of human skin recombinants as an in vitro model for testing the irritation potential of cutaneous irritants. Skin Pharmacol, 1995, Vol. 8:49-59
6. 양은경, 박정극 외, Assessment of Toxic Potential of Industrial Chemicals using Cultured Human Bioartificial Skin Model: Production of Interleukin-1 α and Hydroxyeicosatetraenoic acids, Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology, 2000, Vol. 13: 246-57

7. 양은경, 박정극 외, Editor Review; Development and Application of Bioartificial Skin
International Journal of Artificial Organs, 2000, Vol. 23: 597-600