

## 주름방지용 화장품원료의 안점막 자극성과 피부자극성 및 세포독성과의 비교

이은희 · 이종권 · 김주환 · 정경미 · 정해관 · 이선희 · 정수연 · 홍진태\*  
식품의약품안전청 국립독성연구소

### Comparison of Eye Irritation Potency with Skin Irritation and Cytotoxicity Potency of Anti-wrinkle Agents

Eun Hee Lee, Jong Kwon Lee, Ju Hwan Kim, Kyoung Mi Jung, Hai Kwan Jung,  
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

(Received April 28, 2001)

(Accepted June 14, 2001)

**ABSTRACT :** In the present study, we examined eye irritation of six anti-wrinkle agents (ascorbic acid, glycolic acid, all trans-retinoic acid, ginseng extract, retinol, EB). We also compared eye irritation with skin irritation and cytotoxicity in HaCaT cells by these agents. The highest eye irritation was found in glycolic acid, but all trans-retinoic acid showed the highest skin irritation. The rank of eye irritation was not correlated with the cytotoxicity of agents. This result shows that eye irritation potency by these agents were not correlated with skin irritation potency, and cytotoxicity in HaCaT cells.

**Key Words :** Eye irritation, Anti-wrinkle agents, Skin irritation, Cytotoxicity, Correlationship

#### I. 서 론

기능성화장품이라는 새로운 용어를 도입하여 피부의 미백에 도움을 주는 제품, 피부주름개선에 도움을 주는 제품, 피부를 곱게 태워주거나 자외선으로부터 피부를 보호하는데 도움을 주는 제품으로 규정(화장품법, 2000)하고 이를 인정하고 있다. 이 중에서 주름방지용 화장품은 피부의 건강을 증진시키고 매력을 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 급성독성시험자료, 1차피부자극시험자료, 안점막자극 또는 기타점막자극시험자료, 피부감작성시험자료, 인체사용시험자료, 흡입독성시험자료(분무제의 분사원료에 한함), 원료 물질이 자외선 흡수 가능물질은 광독성시험자료 등의 자료를 검토하여 평가하고있다. 주름방지용 화장품의 안전성을 평가하기 위하여 특별한 추가시험이 요구되지는

않을 것으로 사료된다. 어떠한 안전성 자료가 더 필요한지를 기존의 안전성 평가시험 항목이외의 기초자료를 확보하는 실험의 필요성이 요구된다. 그러나 안전성 평가의 *in vivo* 시험결과를 대체하고자 하는 동물대체 시험법의 개발 필요성이 대두되었으며, 유럽연합(EU)은 이미 1993년에 화장품관련 규정(Cosmetic Directive 76/768/EEC)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(Commission of the European communities, 1997). 따라서 화장품의 안전성 평가를 위한 세계적인 흐름에 동참하기 위하여 동물실험에 대한 대체시험법의 개발이 절실히 필요하나 국내에서는 아직 대체시험법 개발의 연구가 미흡하여 화장품의 안전성평가를 위한 대체시험법의 연구가 시급하다. 특히 안점막자극 대체시험법 연구는 이루어지고 있지 않은 실정이다. 또한 대체시험법 중 세포독성 시험방법을 이용하여 안자극과 피부자극의 상관관계에 대한 연구는 chinese hamster fibroblast V79 cells을 사용하여 neutral red assay를 실시하여 안점막 자극과 피부자극 시

\*To whom correspondence should be addressed

험의 상관관계에 관한 연구 결과 피부자극 시험보다는 안점막자극 시험과 상관관계가 높다는 연구(Ikarashi, 1997)와 MTT assay 방법으로 corneal epithelial cells를 사용하였을 때 안점막자극 시험의 대체가능성이 있다(Yang, 1994)는 보고가 있으나 아직 미흡한 실정이다.

본 연구에서는 주름방지용 화장품에 대한 안전성 평가에 있어서 요구되는 안점막 자극시험을 *in vivo* 방법으로 실시하고, 이 *in vivo* 안점막 자극시험결과 안점막 자극 정도와 피부자극 정도 사이에 주름방지용 화장품원료가 유사한 독성정도를 갖는지를 확인하고 *in vitro* 실험으로 피부자극 대체시험법의 가능성에 대하여 연구가 많이 실시된 HaCaT cell을 이용한 MTT assay 시험을 실시한 후, 주름방지용 화장품 원료의 안점막 자극과 *in vitro* MTT assay와의 사이에 피부자극 시험과 동일 수준으로 상관관계가 있는지를 시험하였다. 또한 피부자극물질과 안점막 자극물질간의 독성에 상관성이 있는지를 연구하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

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 한국담배인삼공사에서 제공받았다. Phosphate buffer saline, sodium bicarbonate, MTT(3-4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5, - diphenyltetrazolium bromide), dimethyl sulfoxide(DMSO)는 Sigma사 제품을 사용하였고, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), nutrient mixture F-12, fetal bovine serum, trypsin EDTA는 Gibco. BRL사 제품을 사용하였다.

### 2. *In vitro* 시험

#### 1) 세포배양

사람의 정상피부에서 얻은 각질세포(keratinocyte)와 SV40 과 융합하여 얻은 세포주로서 사멸되지 않는 정상(immortalized)을 갖고 있는 human immortalized keratinocyte (HaCaT) cells을 독일 암연구센터(German Cancer Research Center, Division of Differentiation and Carcinogenesis *In vitro*)의 Dr. Fusenig로부터 얻어서 사용하였다. 본 실험에서는 HaCaT cell를 nutrient mixture F-12, sodium bicarbonate, penicillin-streptomycin, 5% fetal bovine serum이

보충된 DMEM에서 배양하였다.

#### 2) *In vitro* cytotoxicity assay (MTT reduction test)

96well plate에  $1 \times 10^5$  cells/ml의 세포를 200  $\mu$ 씩 넣어 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 하루정도 배양한 후 시험물질을 처리하여 3시간, 24시간, 48시간, 72시간을 배양하였다. 세척한 각 well에 200  $\mu$ 씩 넣어주고 MTT[3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide] (Sigma Co.)를 2 mg/ml의 농도로 준비하여 50  $\mu$ 씩 첨가한 후 3시간 반응을 시켰다. 각 well당 시험물질 220  $\mu$ 를 제거하고 보라색물질 30  $\mu$ 만 남긴 후 DMSO를 150  $\mu$  첨가하여 microplate mixer상에서 10분간 잘 혼합하여 침전물을 용해시킨 후, 96well plate ELISA reader에서 540 nm 흡광도로 O.D.(optical density) 값을 측정하였다. 모든 시험결과는 세포를 배양하지 않은 well에서 측정된 흡광도에 대하여 보정한 값을 산출하였다.

### 3. *In vivo* 시험

#### 1) 실험동물

안점막자극 시험용으로 2.5~3.0 kg의 New Zeland white 계 토끼를 분양 받아 1주일간 순화기간을 두었다. 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였으며 온도 23±2°C, 습도 55±10%, 12시간 명암주기의 사육조건을 유지하였다.

#### 2) 안자극 시험

안점막자극시험은 OECD 기준 및 Draize법을 준용하여 all trans-retinoic acid, retinol, ascorbic acid, ginseng extract, glycolic acid, EB를 국립독성연구소 표준작업지침서에 따라 관찰하여 평가하였다. 안점막자극 시험의 경우는 시험개시 약 24시간 전에 토끼의 좌우 안구의 각막, 결막, 홍채등의 병변상태를 검사한 후, 시험물질을 토끼의 결막낭(conjunctival sac)에 0.1 ml씩 투여하였으며 1시간, 1일, 2일, 3일, 7일에 안구의 각막, 결막, 홍채등을 관찰하였다.

### 4. 상관관계 분석

시험물질의 세포독성 시험결과를 세포의 성장을 50% 감소시키는 농도인 IC<sub>50</sub>으로 표시하였으며, 그 값은 Litchfield & Wilcoxon(1949)의 방법으로 계산하였다. *In vitro* 시험 결과의 IC<sub>50</sub> 값과 *in vivo* 시험결과 안점막 자극도를 계산한 후, *in vitro* 시험은 세포독성이 높은 순으로 순위(rank)를 정하였으며, *in vivo* 시험도 안점막 자극이 높은 순으로 순위(rank)를 정하여 이들의 상관관계를 Spearman's

rank correlation analysis로 분석하였다.

### III. 결 과

#### 1. *In vitro* 세포독성시험

주름개선효과가 알려진 all trans-retinoic acid, retinol, ascorbic acid, ginseng extract, glycolic acid, EB를 HaCaT cell에 3시간, 24시간, 48시간, 72시간 동안 처리한 후, 세포내의 mitochondrial succinate dehydrogenase 효소 활성을 측정하여 세포 독성을 비교하였다. 모든 시험물질이 농도가 높아짐에 따라 세포독성이 용량의존적으로 증가하였

고 노출시간의 변화에 따른 세포독성도 증가하는 경향을 나타내었다. 각 시험물질을 24시간 노출시켰을 경우의 세포독성을 나타내었다(Fig. 1). 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 IC<sub>50</sub> 값을 산출한 결과 3시간 노

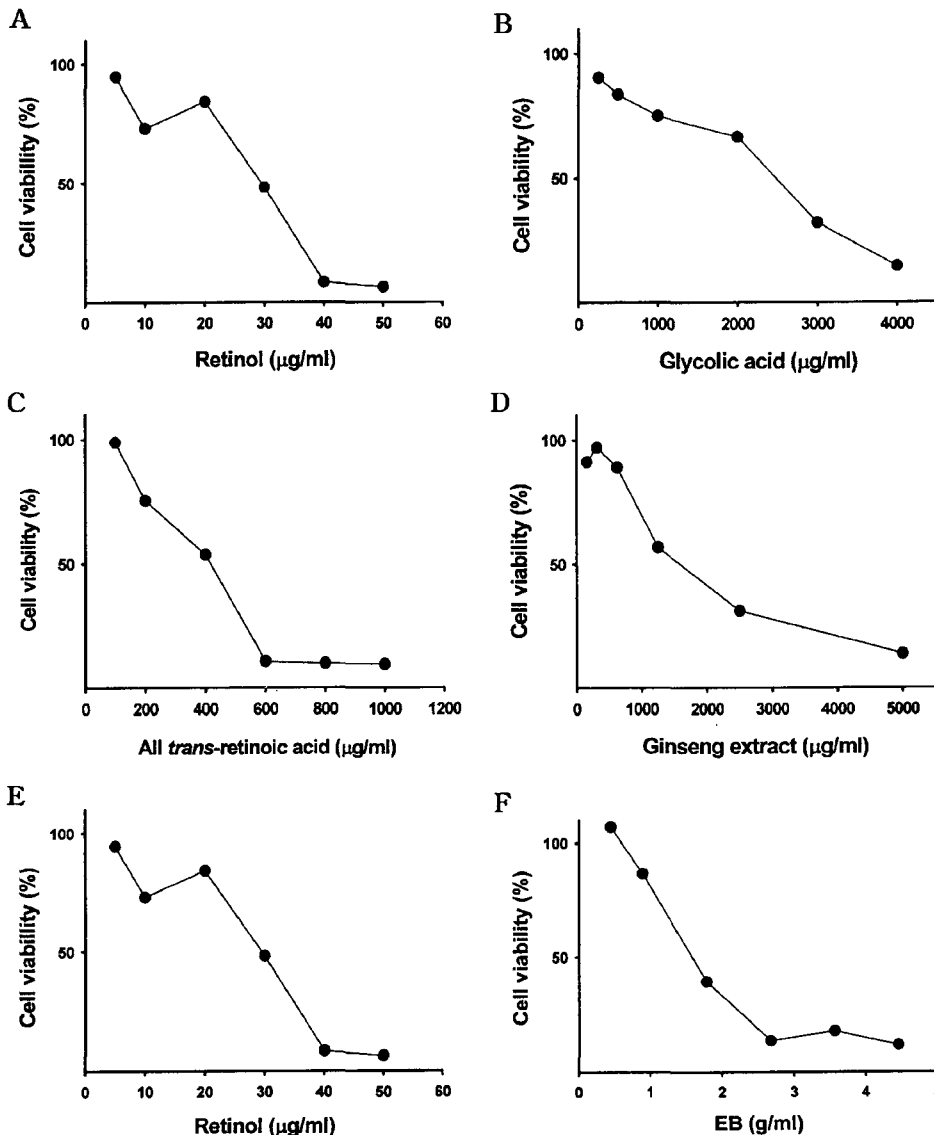


Fig. 1. Cytotoxicity of anti-wrinkle agents using MTT assay in HaCaT cells. A, ascorbic acid; B, glycolic acid; C, all *trans*-retinoic acid; D, ginseng extract; E, retinol; F, EB [Ethanol : butylene glycol (2 : 8) mixture].

**Table 1.** *In vitro* cytotoxicity of anti-wrinkle agents in human keratinocyte (HaCaT) cells exposed for 3 h, 24 h, 48 h and 72 h ( $\mu\text{g/ml}$ )

Chemicals	3 h			24 h			48 h			72 h		
	IC <sub>20</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>80</sub>	IC <sub>20</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>80</sub>	IC <sub>20</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>80</sub>	IC <sub>20</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>80</sub>
Ascorbic acid	86.9	991.7	1131.3	89.2	310.8	1083.5	117.6	291.6	723.5	132.5	294.4	654.0
Glycolic acid	962.1	2720.0	7687.4	603.1	1787.2	5296.0	468.3	1127.5	2714.6	263.3	683.1	1771.8
All trans-retinoic acid	293.1	857.5	2508.3	228.5	378.9	662.8	107.0	219.4	449.8	83.5	171.6	352.8
Ginseng extract	903.0	2238.6	5549.3	594.2	1616.4	4396.9	337.6	805.7	1923.0	146.1	288.7	570.4
Retinol	17.8	45.6	116.7	10.7	20.5	39.3	6.5	13.6	28.6	4.3	9.5	21.1
EB	$3.9 \times 10^6$	$1.1 \times 10^7$	$2.9 \times 10^7$	$9.7 \times 10^5$	$1.8 \times 10^6$	$3.3 \times 10^6$	$7.6 \times 10^5$	$1.3 \times 10^6$	$2.2 \times 10^6$	$4.0 \times 10^5$	$8.0 \times 10^5$	$1.6 \times 10^6$

출된 경우에 retinol이 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 1).

흔탁 및 각막의 범위, 홍채의 반응, 결막의 발적, 부종 및 배출물 유무등을 기준으로 안점막자극을 시험한 결과를 표시하였다(Table 2). 6종의 주름방지제 중 glycolic acid는 A.I.O가 2.67로서 결막의 부종과 발적, 배출물이 관찰되어 안자극이 가장 높았다. Retinol과 ginseng extract, ascorbic acid, retinoic acid는 결막의 발적만 나타났다.

**2. *In vivo* 안자극시험 결과**

주름방지제 중 all trans-retinoic acid, retinol, ascorbic acid, ginseng extract, glycolic acid, EB에 대하여 각막의

**3. *In vitro* 세포독성 시험과 *in vivo* 안자극 시험의 상관관계 비교**

MTT assay를 이용하여 얻은 *in vitro* 시험결과와 *in vivo*

**Table 2.** Eye irritation of 6 anti-wrinkle agents

Test material	Scoring time	Cornea	Conjunctivae	Iris	I.I.O.I.	M.I.O.I.	A.O.I.	Rating
Ascorbic acid	1 hr	0/0/0/0/0	0/1/1/0/0/0	0/0/0/0/0/0	4	0.67	0.67	Non-Irritant
	24 hr	0/0/0/0/0/0	0/1/1/0/0/0	0/0/0/0/0/0	4	0.67		
	48 hr	0/0/0/0/0/0	0/0/0/0/0/0	0/0/0/0/0/0	0	0		
	72 hr	0/0/0/0/0/0	0/0/0/0/0/0	0/0/0/0/0/0	0	0		
	7 day	0/0/0/0/0/0	0/0/0/0/0/0	0/0/0/0/0/0	0	0		
Glycolic acid	1 hr	0/0/0/0/0/0	4/5/4/4/4/3	0/0/0/0/0/0	24	4	2.67	Irritant
	24 hr	0/0/0/0/0/0	2/3/3/3/2/2	0/0/0/0/0/0	15	2.5		
	48 hr	0/0/0/0/0/0	1/3/3/3/3/3	0/0/0/0/0/0	16	2.67		
	72 hr	0/0/0/0/0/0	0/2/1/1/2/0	0/0/0/0/0/0	6	1		
	7 day	0/0/0/0/0/0	1/2/1/0/1/0	0/0/0/0/0/0	5	0.83		
all trans Retinoic acid	1 hr	0/0/0/0/0/0	1/0/2/1/1/1	0/0/0/0/0/0	12	2	2	Non-Irritant
	24 hr	0/0/0/0/0/0	1/1/1/1/1/1	0/0/0/0/0/0	12	2		
	48 hr	0/0/0/0/0/0	0/0/1/1/0/1	0/0/0/0/0/0	6	1		
	72 hr	0/0/0/0/0/0	0/0/1/-/0/0	0/0/0/0/0/0	2	0.4		
	7 day	0/0/0/0/0/0	0/0/0/0/0/0	0/0/0/0/0/0	0	0		
Ginseng extract	1 hr	0/0/0/0/0/0	1/1/1/1/0/0	0/0/0/0/0/0	8	1.33	1.33	Non-Irritant
	24 hr	0/0/0/0/0/0	0/0/0/0/0/0	0/0/0/0/0/0	0	0		
	48 hr	0/0/0/0/0/0	0/0/0/0/0/0	0/0/0/0/0/0	0	0		
	72 hr	0/0/0/0/0/0	0/0/0/0/0/0	0/0/0/0/0/0	0	0		
	7 day	0/0/0/0/0/0	0/0/0/0/0/0	0/0/0/0/0/0	0	0		
Retinol	1 hr	0/0/0/0/0/0	1/0/1/0/1/1	0/0/0/0/0/0	8	1.33	1.33	Non-Irritant
	24 hr	0/0/0/0/0/0	0/0/0/0/0/1	0/0/0/0/0/0	2	0.33		
	48 hr	0/0/0/0/0/0	0/0/0/0/0/0	0/0/0/0/0/0	0	0		
	72 hr	0/0/0/0/0/0	0/0/0/0/0/0	0/0/0/0/0/0	0	0		
	7 day	0/0/0/0/0/0	0/0/0/0/0/0	0/0/0/0/0/0	0	0		
EB	1 hr	0/0/0/0/0/0	0/1/0/0/0/0	0/0/0/0/0/0	0.167	0.167	0.167	Non-Irritant
	24 hr	0/0/0/0/0/0	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	0/0/0/0/0/0	0			
	72 hr	0/0/0/0/0/0	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	0/0/0/0/0/0	0			

**Table 3.** Comparison between cytotoxicity of anti-winkle agents and *in vivo* eye irritation potency

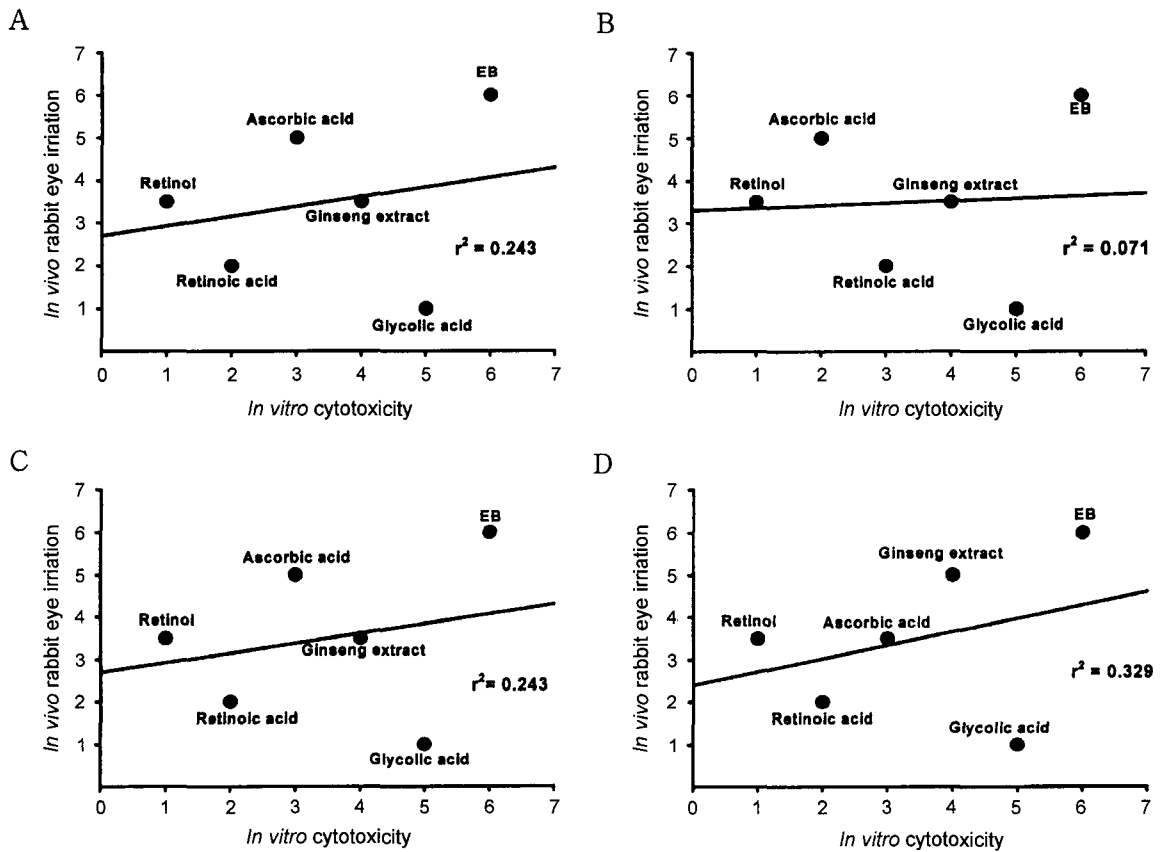
Anti-winkle agents	MTT IC <sub>50</sub>				Rabbit eye irritation test	
	3 hr	24 hr	48 hr	72 hr	A.O.I	Rank
Ascorbic acid	991.7	310.8	291.6	294.4	0.67	5
Glycolic acid	2720	1787.2	1127.5	683.1	2.67	1
All trans-retinoic acid	857.5	378.9	219.4	171.6	2	2
Ginseng extract	2238.6	1616.4	805.7	288.7	1.33	3.5
Retinol	45.6	20.5	13.6	9.48	1.33	3.5
EB	1.06×10 <sup>7</sup>	1.78×10 <sup>6</sup>	1.28×10 <sup>6</sup>	8.04×10 <sup>5</sup>	0.167	6

EB (ethanol : butylene glycol = 2 : 8).

인 안자극시험 결과의 수치와 rank를 제시하였다(Table 3). 그 결과로 *in vitro* 시험결과와 *in vivo* 시험결과와의 상관관계를 Spearman's rank correlation 방법으로 분석하여, 노출시간별로 시험물질에 대한 순위를 그래프로 나타내었다. HaCaT을 이용한 MTT assay(IC<sub>50</sub> 기준)와 토끼를 이용한 안자극시험과의 상관관계는 3시간 노출시켰을 때의 경우  $r^2=0.243$ 이었고, 24시간일 경우는  $r^2=0.071$ 이며, 48시간에서는  $r^2=0.243$ , 72시간에는  $r^2=0.329$ 로서 아주 낮은 correlation을 나타내었다. IC<sub>20</sub> 및 IC<sub>80</sub> 값과의 상관관계는 매우 낮은 correlation을 나타내었다(Fig. 2).

#### 4. *In vivo* 피부자극 시험과 안점막자극 시험의 상관관계 비교

주름방지제로 사용되고있는 retinol, all trans-retinoic acid, ascorbic acid, ginseng extract, glycolic acid, EB 등을 사용하여 전보에 보고한 피부자극시험 결과(이은희, 2001)와 안자극 시험을 실시하여 얻은 각 수치에 따른 rank를 제시하였다(Table 4). 그 결과로 *in vivo* 피부자극시험결과와 *in vivo* 안자극시험결과와의 상관관계를 Spearman's rank correlation 방법으로 분석하여, 각 시험물질에 대한 순위

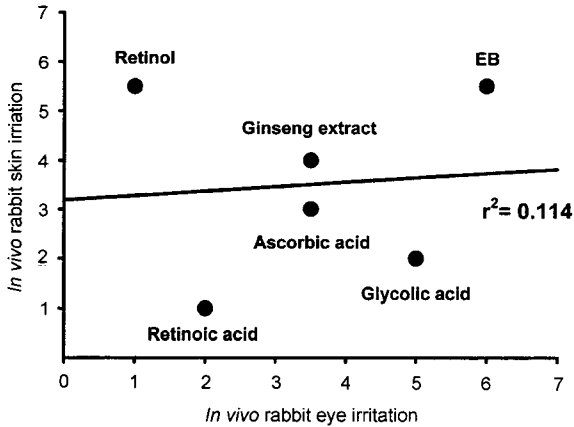


**Fig. 2.** Correlation between *In vitro* cytotoxicity rank by MTT assay using HaCaT cells and *In vivo* eye irritation rank by rabbit eye irritation test (A : 3 h, B : 24 h, C : 48 h, D : 72 h exposure),

**Table 4.** Comparison of *in vivo* eye irritation and skin irritation potency of anti-winkle agents

Anti-winkle agents	Rabbit skin irritation test*		Rabbit eye irritation test	
	P.I.I	Rank	A.O.I	Rank
Ascorbic acid	0.83	2	0.67	5
Glycolic acid	0	5.5	2.67	1
All trans-retinoic acid	0.92	1	2	2
Ginseng extract	0.25	4	1.33	3.5
Retinol	0.42	3	1.33	3.5
EB	0	5.5	0.167	6

\* 이은희등 약학회지 (2001).



**Fig. 3.** Correlation between *in vivo* eye irritation rank and *in vivo* skin irritation rank.

를 그래프로 나타내었다. 각 시험물질을 노출시켜 얻은 상관관계는  $r^2 = 0.114$ 으로 나타내었다(Fig. 3).

#### IV. 고 찰

국내 화장품법의 제정과 더불어 기능성 화장품의 개발이 활발히 이루어지고 있다. 그중 주름방지용 화장품에 대한 관심이 젊게 살고자하는 소비자의 요구와 일치하여 늘어나고 있다. 즉 피부주름관련 기초연구, 주름발생 기전연구 및 주름방지 물질의 개발이 되고있으나, 현재까지 개발된 성분 및 원료들의 안전성을 평가할 수 있는 간단한 *in vitro* 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 자료를 일반적으로 검토하여 실시하고 있다. 또한 각 화장품 원료의 안전성 평가 항목별로 서로 상관성이 있는지 여부에 대한 연구가 진행되어 있지 않은 가운데 필자들의 경험으로 화장품원료가 각 시험항목

별로 특이한 자극성(또는 독성)의 차이가 없이 평가되었던 것에 대하여 물질 별로 시험항목별 차이성이 있을 것으로 추측하여 왔다. 화장품의 안전성 평가를 위한 세계적인 흐름은 동물실험에 대한 대체시험법의 개발이다.

*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 등을 실시하며 주도하고 있다(Marafante 등, 1994; Clothier 등, 1995). EC/HO(European commission/British home office)에서는 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 실시하여(Balls 등, 1995; Clothier 등, 1995) *in vivo*와의 상관관계가 높은 것으로 파악되었으며 안자극시험은 *in vitro* 대체 가능성이 있는 것으로 평가하였다. 그러나 국내에서의 안점막자극 대체시험법 연구는 이루어지고 있지 않은 형편이다.

본 연구에서 *in vivo* 안자극 시험을 실시한 결과 피부자극에서 비자극성을 나타내었던 glycolic acid가 A.O.I = 2.67로서 결막의 부종, 발적, 배출물이 관찰되어 가장 높은 안자극을 나타내었다. 그 다음 순위로 all *trans*-retinoic acid는 A.O.I = 2로 나타났고, ascorbic acid는 피부자극성이 높은 반면 안자극에서 A.O.I = 0.67로 낮게 나타났다. Ginseng extract와 retinol은 A.O.I = 1.33으로 같은 값이 관찰되었고, EB는 피부자극 뿐만 아니라 안자극에서도 가장 낮은 자극성을 나타냈다. Glycolic acid는 자극성으로 ascorbic acid, all *trans*-retinoic acid, ginseng extract, retinol, EB는 비자극성으로 판정되었다. 6가지 주름방지용 화장품물질 중 피부자극시험에서는 가장 자극성이 높은 물질은 all *trans*-retinoic acid였고, 안자극 시험에서는 glycolic acid인 것으로 서로 다른 결과를 나타내 주어 피부자극과 안자극은 물질에 따라 다르게 나타남을 확인하였다. 또한 피부자극 대체시험법으로 가능성이 높으며 재현성이 있는 MTT 방법으로 HaCaT cell을 이용하여 6종의 주름방지용 화장품의 원료를 대상으로 세포독성을 파악하고 그 결과와 안점막 자극치와의 상관관계를 규명하고, 피부자극 대체시험법으로 가능성이 있는 HaCaT cell에서의 MTT 시험법이 안자극 물질의 자극성 스크리닝법으로 이용할 수 있는지를 연구하였다. *In vivo* 안자극시험

과 *in vitro* MTT(IC<sub>50</sub> 기준) 실험한 결과 상관지수가 3시간 일 때  $r^2=0.243$ , 24시간일 경우  $r^2=0.071$ , 48시간과 72시간일 경우 각각  $r^2=0.243$ ,  $r^2=0.329$ 로서 낮은 상관관계를 보였다. 이러한 결과 *in vitro* MTT 실험에 사용된 HaCaT cell이 안자극에 대해 민감성을 나타내주지 못함으로 안자극 대체시험에 적합하지 못하다고 생각된다. 또한 IC<sub>20</sub> 및 IC<sub>80</sub>에 의한 세포독성과 안점막 자극간의 상관관계를 분석한 결과에서도 IC<sub>50</sub>치와 유사하게 상관성이 낮았다. Andrew(1995)은 안자극 대체시험을 위해 rabbit skin 으로부터 얻은 epithelial cell과 rabbit cornea 유래의 3T3 mouse embryo cell을 사용하였고, Chiba(1999)는 화장품 성분으로 HeLa cell을 이용하여 MTT 실험결과 안자극의 대체시험법에 대한 가능성을 제시하였다. 그러나 본 연구에서 HaCaT cell은 안자극시험보다는 피부자극시험의 대체사용법에 적합하며 피부에 민감한 독성을 나타냄으로써 안자극시험 대체 가능성은 없다고 판단된다.

이상의 결과 주름방지용 화장품에 대하여 피부자극 정도와 안점막자극 정도는 물질에 따라 다르게 자극을 나타내며 HaCaT cell을 이용한 MTT 시험법은 안자극시험 *in vitro* 대체시험법으로 대체할 수 없을 것으로 판단된다. 따라서 안자극에 대해 민감성을 나타내 주는 세포를 이용한 연구가 시행되어야 한다고 생각된다.

### 감사의 말씀

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

### 참고문헌

- OECD (2000), OECD Guidelines for the testing of chemicals 404, 405, OECD Publications service, Paris.
- Draize, J.H., Woodard, G. and Calvery, H.O. (1944): Methods for the studying of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J. Pharmacol. Exper. Therap.*, **82**, 377-390.
- Andrew S.P and William M.M. (1995): First-Order Toxicity Assays for Eye Irritation Using Cell Lines: Parameters That Affect *In Vitro* Evaluation. *Fundamental and Applied Toxicology*, **25**, 253-263.
- Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. and Spielmann, H. (1995): The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxic. In Vitro*, **9**(6), 871-929.
- Clothier R.H., Atkinson, K.A., Garle, M.J., Ward, R.K. and Willshaw, A. (1995): The development and evaluation of *in vitro* tests by the frame alternatives laboratory. *ATLA*, **23**, 75-90.
- 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 : 05. 05. 1997.
- Chiba, K., Makino, I., Ohuchi, J., Kasai, Y., Kakishima, H., Tsukumo, K., Uchiyama, T., Miyai, E., Akiyama, J., Okamoto, Y., Kojima, H., Okumura, H., Tsurumi, Y., Usami, M., Katoh, K., Sugiura, S., Kurishita, A., Sunouchi, M., Miyajima, A., Hayashi, M. and Ohno, Y. (1999): Interlaboratory validation of the *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients (9). Evaluation of cytotoxicity test on HeLa cells. *Toxicology In Vitro*, **13**(1), 189-198.
- Ikarashi, Y., Tsuchiya, T. and Nakamura, A. (1997): Cytotoxicity of chemicals used in household products: estimation of eye irritating potency of 25 chemicals tested during 1991-1996. Kokuritsu Iyakuhin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku. **115**, 130-134, abstract.
- Lee, J.K., Kim, D.B., Lee, E.H., Lee, S.H., Ryu, S.R., Choi, K.H., Kim, Y.J. and Kim, P.Y. (1998): In Vitro Skin Irritation Test of Anti-inflammatory Drugs. *J. Toxicol. Pub. Health.*, **14**(3), 315-320.
- Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949): A simplified method of evaluating dose effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **96**, 99-113.
- Marafante, E., Smyrniotis, T. and Balls, M. (1994): ECVAM: The european center for the validation of alternative methods. *Toxic In Vitro*, **8**, 803-805.
- Yang, W. and Acosta, D. (1994): Cytotoxicity potential of surfactant mixtures evaluated by primary cultures of rabbit corneal epithelial cells. *Toxicol Lett.*, **70**(3), 309-318.
- 국립독성연구소, 독성·약리·병리 표준작업지침서 (1999): 식약청 국립독성연구소, 493-501.
- 보건복지부령 제6153호 화장품법 제1장 제2조 2항 : 2000. 1. 12.
- 이은희, 이종권, 박기숙, 정해관, 정수연, 홍진태 (2001): 화장품 원료의 피부자극성과 세포독성과의 관련성. 약학회지 (투고중).