

홍삼가수분해농축액(GS-E3D)의 피부 안전성 평가

표미경¹ · 이경희¹ · 차선우¹ · 박기용² · 이기무^{2*}

¹(재)금산국제인삼약초연구소, ²주세화피앤씨

Skin Safety Evaluation of Pectin Lyase-modified Red Ginseng Extract (GS-E3D)

Mi Kyung Pyo¹, Gyeong Hee Lee¹, Seon Woo Cha¹, Ki Young Park², and Ki Moo Lee^{2*}

¹International Ginseng & Herb Research Institute, Geumsan 32724, Korea

²SEWHA P&C Co., Ltd. 36 Euam-gil, Chung-buk 27860, Korea

Abstract – Pectin lyase-modified red ginseng extract (GS-E3D) is a newly developed ginsenoside Rd-enriched ginseng extract. This study was designed to investigate the skin safety of GS-E3D. Single oral toxicity, single dermal toxicity, bovine corneal opacity and permeability (BCOP) assay, skin irritation test with SkinEthic™ human epidermis model, skin sensitization local lymph node assay, and human patch test, were examined. The oral and dermal LD₅₀ value of GS-E3D was over 2,000 mg/kg in rats. GS-E3D was identified as a non-irritant to skin in BCOP assay, human epidermis models, and patch test from the 32 human subjects. The skin sensitization potential of GS-E3D was less than 25% in local lymph node assay. These results indicate that GS-E3D can be used as a safe ingredient without adverse effects in various skin care products.

Keywords – GS-E3D, *Panax ginseng*, Safety, Skin irritation, Human patch test

고려인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer)은 수천 년간 사용되어져 왔던 전통 약물로 면역력 증진,¹⁾ 항피로 작용,²⁾ 간 기능 회복,³⁾ 혈당강화,⁴⁾ 콜레스테롤 개선,⁵⁾ 및 기억력 개선⁶⁾ 등 식의약품 소재로서의 효능 뿐 아니라 항산화,⁷⁾ 보습, 미백,⁸⁾ 주름개선⁹⁾ 등의 효능이 밝혀짐에 따라 화장품 소재로서도 많이 이용되고 있다. 고려인삼의 대표적인 약리활성 물질은 ginsenoside로 알려져 있으며, ginsenoside Rg1, Re, Rb1, Rb2, Rc 및 Rd 등 주요 ginsenoside를 포함하여 현재 까지 약 40여종이 알려져 있다.¹⁰⁾ 이 중에서 진세노사이드 Rd는 ginsenoside Rb1, Rb2, Rc 등으로부터 미생물이나 효소에 의한 생물전환에 의해 다량 생산되는^{11,12)} 것으로 알려져 있으며, 항산화 작용,¹³⁾ 항염증,^{13,14)} hair follicle 세포의 증식 및 분화 조절 작용¹⁵⁾ 등이 알려져 있다. 본 저자들은 홍삼 추출물을 효소 가수분해하여 ginsenoside Rd의 함량을 증가시킨 홍삼가수분해농축액(GS-E3D)의 제조방법을 표준화하고, GS-E3D의 항염증 작용 및 기전,¹⁶⁾ 항산화 작용과 모발성장의 근원이 되는 모모세포의 증식 촉진, 탈모증을 유발하는 5 α -reductase 발현 억제 작용 등을 확인하여 화장

품 소재로서의 가능성을 제시한 바 있다.¹⁷⁾ 그러나, 화장품 소재로서의 상업화를 위해서는 효능 뿐 아니라 인체에 전신 또는 국소의 피부에 적용했을 때 피부에 흡수되어 감작을 일으키는 알러지성 접촉성 피부염 등에 대한 안전성도 확보되어야 한다. 따라서, 본 연구에서는 GS-E3D를 랫트에 적용하여 급성경구 투여 시에 나타나는 독성 반응과 경피 투여 시에 나타나는 독성 반응을 평가하여 인체에 대한 안전한 농도 범위를 추정하고, 적출된 소 각막을 활용한 안점막 자극 반응과 상업화된 인체피부모델을 활용하여 피부 자극 반응을 평가하여 자극성 물질인지 비자극성 물질인지를 확인하고, 생쥐의 피부에 적용하여 피부 감작성이 있는지 검토한 후에 최종적으로 인체 대상자의 피부에 첩포하여 홍반, 침윤, 구진 및 수포 형성 등의 피부반응을 관찰하여 시험물질에 대한 접촉성 피부염을 일으키는지를 확인하여 향후 화장품 소재로서 인체에 대한 안전성을 확보하기 위하여 진행하였다.

재료 및 방법

시험물질 – 본 연구에 사용된 시험물질 홍삼가수분해농축

*교신저자(E-mail): kmlee6163@hanmail.net
(Tel): +82-43-838-1010

액(GS-E3D)은 4년근 홍삼을 사용하여 금산덕원인삼약초영농조합법인(충남 금산)에서 이전에 보고된 방법¹⁸⁾에 의해 만든 것을 구입하여 사용하였다. 요약하면, 5 brix 홍삼추출물에 중량대비 10%의 펙티나제를 넣고 50°C에서 5일간 반응시킨 후 95°C에서 효소를 불활성화한 다음 농축하여 시료로 사용하였다. GS-E3D는 진세노사이드 Rg1 2.69 mg/g, Re 5.7 mg/g, Rf 2.1 mg/g, Rb1 7.6 mg/g, Rc 6.3 mg/g, Rb2 7.9 mg/g, Rb3 0.8 mg/g, Rd 12.5 mg/g, 20(S)-Rg3 0.6 mg/g, 20(R)-Rg3 0.6 mg/g, Rk1 0.4 mg/g, Rg5 0.7 mg/g이 함유되어 있는 것을 사용하였다.

실험동물 – 본 연구는 Good Laboratory Practices(GLP) 인증기관인 (재)한국화학융합시험연구원 화순에 위탁하여 비임상시험관리기준 식품의약품안전처 고시 제2017-32호(2017년 5월 1일)과 OECD “Principle of Good Laboratory Practice, ENV/MC/CHEM(98)17(as revised in 1997)의 test guideline에 따라 시행되었다. 급성 경구독성 시험과 단회 경피투여 독성시험을 위하여 7주령(200±20 g)의 암·수 SD계 랫트(SPF)를 (주)오리엔트바이오(경기, 가평)에서, 피부감작성 시험을 위하여 CBA/JCrHsd 마우스(SPF) 암컷(8주령, 20±3 g)을 (주)코아텍(경기, 평택)으로부터 공급받아 1주일간의 실험실 순화과정을 거친 후 사용하였고, 동물보호법 및 실험동물에 관한 법률에 근거한 (재)한국화학융합시험연구원의 동물윤리위원회에 의해 승인(IAC2018-D132, IAC2018-D138, IAC2018-D155) 후 실험하였다. 청정동물 사육실 환경은 온도 21.5~22.9°C, 상대습도 51.9~57.8%, 환기횟수 10~20회/h, 조명주기 12시간(08:00~20:00), 조도 150~300 lux로 유지되었으며 실험동물용 케이지(310W×500D×200H mm)에 3마리 이하로 수용하였고, 사료는 Rodent Diet 20 5053(Labdiet, USA)와 음수는 R/O수를 자유롭게 섭취하도록 하였다. 개체식별은 유성팬을 이용하여 꼬리에 표시하였고, 케이지는 개체식별카드를 부착하여 식별하였으며, 군분리는 건강한 개체를 선별하여 각군간 평균체중 및 표준편차가 균일하도록 무작위법으로 군분리를 실시하였다.

단회 급성 경구투여 독성시험 – 식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 “화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인 II – 단회독성시험법”에 따라 홍삼가수분해농축액에 대한 급성경구독성시험을 실시하였다. 시험동물은 SD계 암컷 랫트를 사용하여 투여액량은 10 mL/kg body weight(B.W.)으로 하였고, 시험물질 투여용량은 300 mg/kg B.W.(1st, 2nd step)와 2000 mg/kg B.W.(3rd, 4th)로 단계를 나누어 각각 3마리에 약 18시간 절식시킨 실험동물에 경구투여용 존대를 장착한 주사기를 이용하여 위내에 1회 강제 경구투여 하였고, 시험물질 투여간격은 일반증상 및 정도에 의해 결정되었다. 일반증상은 모든 동물에 대하여 매일 1회 증상관찰을 실시하였으며, 투여당일에는 투여 후 0.5, 1, 2, 3 시간을 포함하여 4시간까지는 매 시간마다 관찰하였으며, 투여 후 14

일까지 관찰하였다. 체중은 도입 시, 군 분리시, 시험물질 투여 개시 직전, 투여개시 후 1, 3, 7 일 및 14 일에 측정하였다. 부검은 모든 생존동물의 외관 검사를 실시 후 방열치사하여 육안으로 장기를 검사하였다. 이상 장기는 발생하지 않아 조직병리검사는 실시하지 않았다.

단회 경피투여 독성시험 – 홍삼가수분해농축액에 대한 단회 경피투여 독성시험을 위해 식품의약품안전처 고시 중 “기능성화장품 심사에 관한 규정”에 따라 투여액량을 산출하였다. 시험물질의 경피 투여를 위하여 투여 전날 실험동물의 등 부위를 가급적 피부가 손상되지 않도록 넓게 제모하였고, 도포면적은 체표면적의 10% 정도(4×4 cm²)로 하였다. 시험물질을 거즈에 도포 후 제모한 부위에 부착하고, 유실을 막기 위해 비자극성 테이프(Tegaderm, 3M)와 탄력붕대(Coban, 3M)로 24시간 고정하였다. 노출 종료 후 도포물을 제거하고 피부에 남아 있는 시험물질 조제물을 멸균 증류수로 잘 닦아 주었다. 투여용량 설정은 2,000 mg/kg body weight(B.W.)용량을 최고용량으로 설정하여 공비를 2로 두어 1,000 및 500 mg/kg B.W. 용량으로 설정하였고, 대조군은 멸균증류수를 투여하였다. SD계 랫트 암컷과 수컷 각각 5 마리씩에 각각 시험물질을 경피투여 한 후 14일간 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검 소견을 관찰하였다. 일반증상 관찰은 1일 1회 투여 후 14일간 관찰하였으며, 투여당일에는 투여 후 0.5, 1, 2, 3 및 4 시간에 관찰하였다. 체중은 도입 시, 군 분리 시, 시험물질 투여 개시 직전, 투여개시 후 7 일 및 14 일에 측정하였다. 부검은 투여 후 14일째 모든 생존동물의 외관 검사를 실시 후, 부검하여 육안으로 장기를 검사하였다.

안점막 자극 시험 – 홍삼가수분해농축액에 대한 소각막을 이용한 안점막 자극시험은 식품의약품안전처 안내서 “화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인 III – 소각막을 이용한 안점막자극시험법(BCOP 시험법)”에 따라 실시하였다. 시험에 사용한 소 안구는 도축장(화정식품, 충남 논산)에서 실험당일 도축된 소의 안구를 적용 가이드라인 기준에 따라 냉장(2.4~4.1°C) 상태의 1x HBSS 용액(containing final concentration 100 IU/mL and 100 µg/mL penicillin-streptomycin)에 담아 운반하였다. 실험실로 운반된 소의 안구는 육안으로 혼탁도의 증가여부, 균집, 신생혈관 생성, 색소침착 등을 검사하여 결함이 없는 안구만을 선별하였고, 선별한 안구에서 각막의 장축을 버니어 캘리퍼스(KG-EQM-429)를 이용하여 지름을 측정하였으며, 허용범위(27.5~28.5 mm)에서 벗어난 각막은 시험에서 제외하였다. 각막은 육안 검사시 손상이 없는 안구를 공막 가장자리 2~3 mm를 포함하여 적출하였고, 미리 배양기에서 항온 상태를 유지한 각막홀더에 적출된 각막을 장착하고 32°C 항온상태의 MEM(without phenol red)을 각막홀더 전후 챔버에 채운 후 32±1°C의 배양기에서 1시간 동안 전배양 하였다. 전배양 후, 전

후방 챔버의 MEM을 새 MEM으로 교체하고 혼탁도측정기(KG-EQM-424)를 이용하여 혼탁도를 측정하였다. 혼탁도의 계산은 $(10/I - 0.9894) / 0.0251$ (I: 빈 각막홀더의 lux값, I: 시험 후 각막홀더의 lux값)의 공식에 따라 계산하고, 혼탁도 7 이상이 나온 각막은 시험에서 제외시켰다. 적합관정을 받은 각막을 균분리 프로그램(KG-AAT-008)에 따라 평균과 표준편차를 이용하여 각 군당 3 개씩 무작위로 균분리 하였고, 각막홀더에 라벨테이프를 부착하여 각막식별에 이용하였다.

피부자극 시험 - 시험물질 홍삼 가수 분해 농축액의 피부 자극성의 평가는 상업화되어 있는 인체피부모델인 SKINETHIC™, Reconstructed Human Epidermis Model (EPISKIN, LYON France)을 이용하였고, 음성대조물질은 phosphate buffer saline(PBS, Lonza)을 양성대조물질은 5% sodium dodecyl sulfate(Sigma-Aldrich)을 사용하였다. 시험물질의 간섭확인을 위하여 24 well plate의 각 well에 0.3 mL의 멸균증류수와 시험물질 16 µL을 넣고 실온에서 1 시간 ±5 분간 배양하였다. 시험물질의 색변화가 관찰되지 않아 생체 인체피부조직에서의 시험물질 발색확인시험은 생략하였다. MTT 용액과의 환원성 확인 24 well plate의 각 well에 0.3 mL의 MTT 용액을 넣고, 시험물질 16 µL을 넣은 상태로 CO₂ 세포배양기에서 3 시간 ±5 분간 배양하였다. 시험물질의 색변화가 관찰되지 않아 동결사멸조직에서의 시험물질 발색확인시험은 생략하였다. 본시험의 구성은 음성대조군, 양성대조군 및 시험물질군 총 3 군으로 각 군당 3 개 조직의 반복시료(three replicate tissue)로 설정하였으며, 단회 시험으로 진행하였다. 피부자극시험을 위하여 인체피부모델은 insert와 agarose gel 사이에 공기방울은 없는지, 조직의 표면이 평평하고 물기는 없는지, agarose gel이 탄력적인 고형 상태를 유지하고 있는지를 확인하고, 이상이 없는 조직을 선택하여 시험에 사용하였으며, 인체피부모델의 안정화를 위하여 growth medium 1 mL이 담겨있는 6 well plate에 조직을 옮겨 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 시험물질 적용 전까지 2 시간 이상 전배양을 통해 안정화시켰다. 시험물질의 적용은 maintenance medium 0.3 mL이 담겨있는 24 well plate에 조직을 옮긴 후 16 µL(+ 나일론 메쉬)씩 조직 당 1 분 간격으로 적용하고, 클린벤치 안에서 42 분(± 1 분)간 노출시켰다. 시험물질의 세척은 조직 당 시험물질 적용 간격 시간에 맞춰 PBS 용액 1 mL을 조직 내부에 분사하고 털어내는 방법으로 시험물질 및 나일론 메쉬를 제거하였고, 같은 방법으로 총 25 회(PBS 1 mL/1 회) 반복하여 세척하였다. 조직 표면에 남아 있는 잔여물질을 제거한 후 growth medium 2 mL이 담겨있는 6 well plate에 조직을 옮겨 담고 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 42 시간 ± 1 시간 동안 배양하였다. 시험물질이 인체피부모델에 미치는 가역적 손상을 아래와 같이 평가하기 위하여 1 mg/mL MTT 용액 0.3 mL이 담겨있는 24 well plate에 조직을

옮긴 후, 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 3 시간 ± 5 분간 배양 후, isopropanol 0.8 mL이 담겨있는 24 well plate에 조직을 옮긴 후 조직 내부에 isopropanol 0.7 mL을 추가하여 shaking하며 2 시간 ± 5 분간 formazan을 추출하였다. Formazan 결정체가 보이지 않도록 피펫팅 후 200 µL 씩 96 well plate에 옮겨 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 음성대조물질(생존율을 100%로 정함)로 부터의 결과로 표준화하여 세포생존율(%)을 산출하였다. 피부자극 시험 평가는 세포생존율이 50% 초과인 경우는 Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals(GHS)에 따른 분류에서 '범주 외'에 해당하는 피부 비자극성 물질로, 50% 이하인 경우는 GHS '범주 2'에 해당하는 피부 자극성 물질로 판정하였다.

피부감작성 시험 - 마우스에 대한 홍삼가수분해농축액의 피부감작성을 평가하기 위하여 국소립프절시험법-5-Bromo-2'-deoxyuridine(BrdU)-ELISA를 활용하여 실험하였다. 홍삼가수분해농축액은 Propylene Glycol(PG)을 이용하여 예비 실험으로 용해 가능한 10, 25, 50, 75 및 100% 으로 진탕 조제 하였으며, 본 시험은 예비시험을 통해 설정된 10, 25 및 50% 농도로 진탕 조제하여 사용하였다. 양성대조물질은 α-Hexyl cinnamic aldehyde(HCA)는 순도환산하여 사용하였고, 20% olive oil in acetone을 사용하여 투여농도 25%로 조제하여 사용하였다. 시험동물은 피부감작성시험에 많이 이용되는 CBA/JCrHsd 마우스(SPF) 암컷(8주령, 20±3 g)를 (주)코아텍(경기, 평택)에서 공급받아 1주일간의 검역 및 순화기간을 거쳐 체중변화 및 일반 건강상태를 관찰한 후 건강한 개체를 선별하여 무작위법으로 균분리를 실시하였다. 시험군은 각 군당 5마리를 사용하였으며, 시험물질 용매대조군(G1), 양성대조물질 용매대조군(G2), 시험물질군 10%(G3), 25%(G4), 50%(G5), 양성대조군(G6)으로 설정하였다. 시험 물질 25 µL를 양쪽 귀의 뒷(배)면에 micro pipette을 이용하여 1 일, 2 일, 3 일에 각각 처리하였고 휴지기 4 일에는 처리하지 않았다. 시험 5 일차에 phosphate-buffered saline(PBS)에 10 mg/mL로 조제된 BrdU 용액 0.5 mL(5 mg/mouse)를 복강 내 투여후 24 시간 후 mouse 양쪽 이개 림프절을 분리하였다. 분리한 이개림프절은 70 µm nylon mesh를 이용하여 단일세포로 분리하고, 음성대조군의 흡광도 값이 0.1~0.2 이내가 되도록 PBS를 이용하여 세포현탁액의 총량을 18 mL로 맞춰 준비하였다. 세포현탁액을 BrdU kit를 이용하여 cell proliferation assay를 실시하였고, 다체 널플레이트리더기(KG-EQM-412)를 이용하여 370 nm 및 492 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 실험동물에 대한 일반증상은 모든 동물에 대하여 1 일 1 회 일반증상의 변화 및 사망유무를 관찰하였으며, 체중은 동물 도입시, 실험 진행 1 일 및 6 일째에 개체별 체중을 측정하였다. 귀의 두께는 실험진행 1 일, 3 일 및 6 일째에 두께측정기(KG-EQM-

402)를 이용하여 개체별 좌·우측 귀 두께를 측정하였다. 시험물질에 대한 피부 반응은 홍반이 나타나지 않음은 0점, 매우 미세한 홍반은 1점, 뚜렷한 홍반은 2점, 중등도 이상의 홍반은 3점, 심각한 홍반(홍반 관찰이 어려울 정도의 가피 형성)은 4점으로 평가하였으며, 피부감작성은 각 시험군의 평균 자극지수(Stimulation index, S.I.)로 평가하여 평균 자극지수가 1.6 이상(S.I. ≥ 1.6)일 경우, 양성으로 판정하였다.

인체 첩포 시험 - 홍삼가수분해농축액의 인체 첩포 시험은 기능성화장품 심사에 관한 규정(식품의약품안전처 고시 제2017-42호), International Contact Dermatitis Research Group(ICDRG)의 판정기준 및 한국화학융합시험연구원 표준작업지침서(SOP)에 따라 시험을 수행하였다. 시험기간은 2018년 02월 19일 부터 2018년 02월 22일까지였으며, 시험대상자는 만 20세 이상 59세 이하 성인 남녀를 대상으로 본 시험에 대하여 충분히 설명을 듣고, 동의서를 작성하여 서명한 사람 중에서 피부 질환을 포함하는 급, 만성 신체 질환이 없고, 시험기간 동안 추적 관찰이 가능한 건강한 사람 중에서 기능성화장품 심사에 관한 규정(식품의약품안전처 고시 제2017-42호)의 독성시험법 중 인체 첩포 시험 방법에 근거하여 32명을 시험대상자로 선정하였으며, 시험대상 지원자 중 임신 또는 수유중인 여성과 임신 가능성이 있는 여성, 피부질환 치료를 위해 스테로이드가 함유된 피부 외용제를 1개월 이상 사용하거나, 민감성, 과민성 피부를 가진 사람, 동일한 시험에 참가한 뒤 4주가 경과되지 않은 사람, 시험부위에 점, 여드름, 홍반, 모세혈관확장 등의 피부 이상 소견이 있는 사람, 연구 시작 전 6개월 내에 시험부위에 시술을 받은 사람, 그 외 시험책임자의 판단으로 시험에 부적합하다고 생각되는 사람은 제외하였다. 또한, 시험대상자가 시험참여 동의를 철회하거나, 시험 진행 과정 중 개인사정에 의해 추적관찰이 어려운 경우, 시험 부위에 과도한 자외선 노출을 하거나 지나친 음주, 흡연 등으로 결과의 판정에 장애가 발생한 경우, 시험부위에 소양감이나 홍반 등의 유해사례가 발생하거나 시험대상자가 시험담당자의 지시를 따르지 않는 경우에는 시험대상자의 시험 참여를 중지시키고 이를 시험결과 산정에서 제외하였다. 시험부위는 시험대상자의 등 중 피부 이상 소견이 관찰되지 않는 부위를 정제수

로 세척한 후 약 5분간 자연건조 한 후, 시험시료를 20 μ L 만큼 첩포에 로딩한 후 24시간 동안 폐쇄 첩포한 후, 첩포를 제거하고 30분 후, 24시간 후 및 48시간 후에 각 시험부위의 피부 반응을 평가하였다. 시험부위 육안평가는 International Contact Dermatitis Research Group(ICDRG) 판정기준에 따라 2인 이상의 시험자가 진행하였으며, 두 시험자간의 판정 결과가 상이할 경우 더 높은 등급을 선택하였다. 판정 등급은 자극이 없을 경우에 0점, 희미한 홍반을 가진 불확실한 반응에는 1점, 홍반, 침윤 또는 구진을 가진 약한 양성 반응에는 2점, 홍반, 침윤, 구진 및 소수포가 형성된 강한 양성 반응은 3점, 진한 홍반, 침윤 및 불규칙한 수포 형성 등의 매우 강한 양성 반응은 4점으로 평가하였다. 육안판정 후 아래의 공식을 이용하여 각 시험부위에 대한 평균 피부 반응도를 계산하였으며 피부 반응도를 바탕으로 인체 첩포 시험 결과를 판정하였다. 즉 피부 반응도 0.00~0.75는 무자극, 0.76~1.50는 미자극, 1.51~2.50는 경자극, 2.51~4.00은 중자극, 4.01~5.00은 강자극으로 판정하였다. 이상 반응은 매회 시험대상자가 방문할 때마다 홍반(erythema), 부종(edema), 인설(scaling), 가려움(itching), 자통(stinging), 작열감(burning), 뻣뻣함(tightness), 따끔거림(prickling) 등과 같은 이상반응 여부에 관하여 평가하였다.

$$\text{평균피부반응도} = [\text{판정점수의총합} / (\text{최고판정점수} \times \text{첩포 제거후평가횟수} \times \text{시험대상자수})] \times 5$$

통계분석 - 실험결과는 3반복 실험을 통하여 평균 \pm 표준편차(mean \pm S.D.)로 표시하였으며, 통계처리는 SPSS 19(SPSS Inc., Chicago, USA) 통계프로그램을 이용하여 Levene's test를 통하여 동질성 검정을 수행하였고, ANOVA 분석과 Dunnett의 T3 다중검정에 의해 $p < 0.05$ 수준에서 평균간의 유의성을 판정하였다.

결과 및 고찰

급성 경구독성 시험 - 홍삼가수분해농축액을 SD계 암컷 랫트에 300 mg/kg B.W. (1st, 2nd step)와 2,000 mg/kg B.W.

Table I. Mortality, clinical signs, mean body weights in rats after single oral administration of GS-E3D

Group	Dose (mg/kg)	Mortality (%)	Clinical signs	Body weight (g) (Days after administration)				
				0	1	3	7	14
G1	300	0(0/3)*	Normal	197.0 \pm 6.6	220.0 \pm 6.6	230.1 \pm 6.8	240.8 \pm 7.7	245.9 \pm 11.5
G2	300	0(0/3)	Normal	213.3 \pm 4.8	240.8 \pm 6.4	241.7 \pm 8.7	251.1 \pm 6.8	251.8 \pm 10.0
G3	2,000	0(0/3)	Normal	203.1 \pm 9.7	231.7 \pm 10.8	238.0 \pm 10.4	244.3 \pm 10.4	252.6 \pm 10.2
G4	2,000	0(0/3)	Normal	233.0 \pm 6.3	259.1 \pm 5.1	267.7 \pm 6.3	276.0 \pm 7.9	284.3 \pm 4.8

*; Number of dead animals/ number of tested animals, G1; 1st step, G2; 2nd step, G3; 3rd step, G4; 4th step

(3rd, 4th)을 단계를 나누어 각각 3마리에 1회 경구투여 한 후 14일간 사망률, 이상 증상, 체중 변화 등을 관찰하였다(Table I). 실험기간 중 홍삼가수분해농축액 투여에 의해 사망한 동물이나 이상증상은 관찰되지 않았다. 체중변화는 경구투여 후 1, 3, 7, 14일에 측정하였는데, 300 mg/kg B.W. (2nd step)에서 1개의 개체가 14일 체중이 7일 체중 보다, 또 다른 개체가 3일 체중이 1일 체중보다 약간 감소하게 측정되었으나 일반 증상에서 이상 소견이 관찰되지 않아 해당개체의 체중이 일시적으로 감소하여 나타난 우발적인 체중 변화로 판단되었다. 이외의 홍삼가수분해농축액을 투여한 모든 투여군에서 정상적인 체중 증가가 관찰되었다. 투여후 14일에 외관검사를 실시한 후 시행한 부검에서 모든 투여군의 동물에서 이상소견이 관찰되지 않았다. 이상의 결과로부터 홍삼가수분해농축액은 국제적으로 공인되고 조화된 화학물질 및 혼합물의 분류 시스템 GHS(Globally Harmonized Classification System for Chemical Substances and Mixtures) Category 5(2000 mg/kg body weight < LD₅₀ < 5000 mg/kg body weight)로 분류되었다.

단회 경피투여 독성시험 - 단회 경피투여 독성시험을 위하여 홍삼가수분해농축액 500, 1,000, 2,000 mg/kg B.W.을 SD계의 암·수 랫트의 피부에 도포한 후 14일간 사망률, 일반 증상, 체중 변화들을 관찰하여 Table II에 나타내었다. 홍삼가수분해농축액을 투여한 모든 개체에서의 동물의 사망

이나 이상 증상은 관찰되지 않았다. 체중은 암컷 시험물질 투여군 일부 개체에서 부형제 대조군에 비해 체중감소가 나타났으나, 통계학적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았고, 경피투여 종료 후 투여부위의 육안적인 관찰 결과 시험물질 투여와 관련된 이상소견이 모든 개체에서 발견되지 않았으며, 부검에 의한 모든 장기에 대한 육안 관찰에서도 이상 소견이 관찰되지 않은 것으로 보아 시험물질 투여에 의한 영향은 아닌 것으로 사료되었다. 이와 같이 랫트에 홍삼가수분해농축액을 단회 경피투여 하였을 경우 시험물질 투여와 관련된 일반증상 소견과 부검소견 결과에서 독성학적인 소견이 관찰되지 않았으므로 개략의 치사량은 암수 모두 2,000 mg/kg B.W. 이상으로 사료되었다.

안점막 자극 시험 - 소각막을 이용한 안점막 자극시험 (Bovine Corneal Opacity and Permeability test, BCOP)은 국제적으로 대두되고 있는 동물대체시험법으로 소 각막의 혼탁 유발 및 투과성 증가를 측정함으로써 눈에 부식성이 있거나 심한 자극을 유발할 가능성이 있는 실험물질을 평가하는 과정을 포함하고 있다.¹⁸⁾ 안점막자극지수는 시험물질에 의한 적출된 각막의 혼탁도와 투과도에 의해 산출되었다. Table III에서 나타낸 바와 같이 실험기간 중 홍삼가수분해농축액 적용에 의한 각막의 혼탁도 변화는 관찰되지 않았으며, 투과도의 증가는 미약하게 관찰되었다. 홍삼가수분해농축액의 적용군(G3)에서 안점막자극지수(IVIS)가 평

Table II. Mortality, clinical signs, mean body weights in rats after single dermal administration of GS-E3D

Group	Dose (mg/kg)	Sex	Mortality (%)	Clinical signs	Mean body weight (g) (Days after administration)		
					0	7	14
G1	0	M	0(0/5)	Normal	289.1± 6.1	338.6±11.1	381.3±20.5
		F	0(0/5)	Normal	238.6± 4.2	374.9±14.3	302.3±22.7
G2	500	M	0(0/5)	Normal	289.4±13.5	330.6±15.6	374.9±20.6
		F	0(0/5)	Normal	236.5±10.0	261.9±15.2	266.9± 8.6
G3	1,000	M	0(0/5)	Normal	287.1± 8.4	326.8±17.8	366.4±24.7
		F	0(0/5)	Normal	236.6± 7.7	262.3±10.5	278.3± 8.0
G4	2,000	M	0(0/5)	Normal	291.0± 6.1	334.7±14.1	375.1±15.4
		F	0(0/5)	Normal	237.6± 5.0	262.6± 7.1	272.1± 4.7

G1; negative control group, G2 ~ G4; GS-E3D treated group, M; male, F; female

Table III. Opacity and Permeability score, and IVIS after eye irritation of GS-E3D

Group	Test materials	Dose	Opacity Score(unit)	Permeability score(OD490)	IVIS*
G1	Water	neat	-0.3±0.4	0.003±0.001	-0.2±0.4
G2	Ethyl alcohol, Pure	neat	18.5±0.4	1.068±0.201	34.5±3.3
G3	GS-E3D	neat	-0.3±0.6	0.023±0.019	0.1±0.6

IVIS*; in vitro irritancy score, opacity score + (15 x permeability score), G1; negative control group, G2; positive control group, G3; GS-E3D treated group

균 0.1±0.6으로 산출되어 ‘UN GHS Category: 미분류(No Category)’에 해당함을 확인할 수 있었다. 또한, 음성대조물질인 water는 -0.2±0.4로 ‘UN GHS Category: 미분류(No Category)’를 확인하였으며, 양성대조물질인 ethyl alcohol, Pure의 경우 34.5±3.3으로 산출되어 ‘UN GHS Category: 예측할 수 없음’임을 확인할 수 있었다. 양성대조물질의 결과 mean of historical data ± 2 standard deviation 범위 내의 결과를 확인하여 시험결과는 유효하다고 사료되었다. 이상의 결과로부터 홍삼가수분해농축액은 BCOP시험법을 이용한 안점막자극 평가에서 ‘UN GHS Category: 미분류(No Category)’에 해당하는 물질로 평가되었다.

피부자극 시험 - 화상이나 상처치료를 위해 개발된 인공 피부 모델은 피부독성을 평가하는데 이용되어져 오면서 화장품 산업과 제약업에서 피부자극성 대체시험법으로 많이 활용되고 있다.¹⁹⁾ SkineThic™ 인체피부모델은 피부자극 대체 시험법에 사용될 수 있는 인공피부 상업 모델로 형태, 생체막 지질조성, 생화학적 지표 등이 인간의 피부 조직과 유사하여 피부자극시험에 유용하며 인체시험결과와도 유사한 것으로 알려져 있다.^{20,21)} 홍삼가수분해농축액의 피부자극성 시험은 상업화된 SkineThic™ 인체피부모델을 활용하였으며, 시험물질을 인체피부모델에 적용하여 세척한 후 42 ± 1 시간 동안 배양하여 시험물질이 인체 피부모델에 미치는 가역적 손상을 평가하였다. 시험물질 간섭확인시험을 위한 예비시험에서 시험물질의 직접적인 염색 및 MTT 용액과의

환원성과 관련된 색변화는 관찰되지 않아 세포생존을 보정을 위한 추가 시험을 실시하지 않았다. 각 군당 3 개 조직의 반복시험으로 설정된 총 3 군의 본 시험에서 인체피부모델이 시험기간 동안 안정적으로 배양되어 음성대조군(G1)의 흡광도 값이 1.821로 측정되어 실험에 대한 성립조건(0.8 ≤ O.D.₅₇₀ ≤ 3.0)을 확보하였다(Table V). 평균 세포생존율은 음성대조군(G1)의 흡광도 값과 대비하여 양성대조군(G2)의 경우, 1.1 ± 0.0%로 산출되었고, 시험물질군(G3)의 경우 77.4 ± 10.3%로 산출되어(Table IV) 정해진 역치 수준(세포 생존율 50%)을 초과한 세포생존율을 나타내면서 시험물질은 피부 비자극성 물질로 확인되었다. 이상의 결과로부터, SkineThic™ 인체피부모델에 대한 피부자극성시험에서 홍삼가수분해농축액은 Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals(GHS)에 따른 분류에서 ‘범주 외’에 해당하는 피부 비자극성 물질로 판정되었다.

피부감작성 시험 - 알레르기성 접촉피부염은 피부자극에 의해 일어나는 자극성 접촉피부염과 달리 알레르겐에 감작되어 나타나는 면역반응으로 피부감작성은 화장품 안전성 평가에서 꼭 필요한 항목으로 알려져 있다.²²⁾ 피부감작성 시험법은 Guinea Pig 모델이 가장 보편적인 방법이었으나 많은 개체가 필요하고 장기간의 실험소요기간으로 인해 *in vitro* 및 *in vivo* 마우스 피부감작성 시험법으로 대체되어 이루어지고 있다.¹⁹⁾ *In vivo* 대체시험법인 국소림프절시험법은

Table IV. Cell viability of GS-E3D in SKINETHIC™ human skin model

Group	Substance	Dose (%)	Optical density (570 nm)	Cell viability (%)
G1	PBS	-	1.821±0.056	100.0± 3.1
G2	SDS	5	0.021±0.000	1.1± 0.0
G3	GS-E3D	100	1.410±0.188	77.4±10.3

G1; negative control group, G2; positive control group, G3; GS-E3D treated group, PBS; phosphate buffer saline, SDS; sodium dodecyl sulfate

Table V. The results of skin sensitization of GS-E3D in local lymph node assay

Group	Dose (%)	Mortality (dead/total)	Clinical signs	Skin response (score)	Change of body weights (%)	Change of ear thickness (%)	BrdU L.I.	S.I.
NC	G1	0(0/5)*	Normal	0	2.50	0.00	0.141±0.032	1.0
	G2	0(0/5)	Normal	0	3.10	0.00	0.158±0.035	1.0
TS	G3	10	0(0/5)	Normal	2.39	0.00	0.125±0.028	0.9
	G4	25	0(0/5)	Normal	3.37	0.00	0.315±0.119	2.2
	G5	50	0(0/5)	Normal	3.59	0.00	0.480±0.120	3.4
PC	G6	25	0(0/5)	Normal	5.74	0.00	0.414±0.056	2.6

NC; negative control, TS; test substance(GS-E3D), PC; positive control, *; number of dead animals/ number of tested animals, BrdU L.I.; BrdU labelling index = blank370 - blank492, S.I.; stimulation index = mean of BrdU L.I. in test substance group / mean of BrdU L.I. in negative control group

Table VI. Skin reactivity and irritancy after removing of GS-E3D patch in human contact dermatitis

Group	Subjects	Score	Number of skin irritation			Skin reactivity	Skin irritancy
			30 min	24 hrs	48 hrs		
G1	32	1	0	0	0	0.00	No response
		2	0	0	0		
		3	0	0	0		
G2	32	1	14	7	9	0.51	No response
		2	0	0	0		
		3	2	1	0		

G1; No application group, G2; GS-E3D treated group, average of age = 47.3±9.3

실험동물의 고통과 사용량을 최소화 한 실험법으로 OECD에 채택된 유일한 감각성 대체시험 법으로 인간을 대상으로 얻은 결과와 정확도가 72%로 높은 방법으로 알려져 있다.²³⁾ 홍삼가수분해농축액의 피부감각성을 평가하기 위하여 마우스를 활용한 국소림프절시험법-BrdU-ELISA을 시행하여 실험동물의 사망률, 일반증상, 체중변화, 귀 두께 변화, 처리부위 피부반응 및 평균 자극지수 (Stimulation index, S.I.)를 평가하였다(Table V). 예비시험 결과, 본시험의 군구성은 용매대조군(시험물질 용매 및 양성대조물질 용매), 10%(v/v), 25%(v/v) 및 50%(v/v) 농도의 시험물질군과 25%(v/v) 농도의 양성대조군의 총 6 군으로 각 군당 5 마리씩 설정하였다. 실험기간 중 모든 처리군에서 사망동물 및 피부반응을 포함한 이상증상은 관찰되지 않았고, 체중은 모든 처리군에서 용매대조군과 비교하여 유의적인 체중변화가 관찰되지 않았다. 귀 두께 측정치도 모든 처리군에서 용매대조군과 비교하여 유의적인 변화는 관찰되지 않았으며, 시험물질 처리부위를 관찰한 결과, 모든 처리군에서 시험물질 영향으로 인한 국부적 피부자극이 관찰되지 않았다. 자극지수(Stimulation index, S.I.)를 산출한 결과, 10%(v/v), 25%(v/v) 및 50%(v/v) (Group 3, Group 4, Group 5)의 경우 0.9, 2.2 및 3.4 로 산출되었고, 양성대조군 (Group 6)의 경우, 2.6 로 산출되었다. 이상의 결과로부터 mouse에 대한 피부감각성시험에서 시험물질인 홍삼가수분해농축액은 25%(v/v) 미만의 농도에서 피부감각성이 유발되지 않음을 확인하였다.

인체 첩포 시험 - 인체 첩포 시험은 지연형 과민반응 혹은 알레르기접촉피부염 진단에 표준 진단법으로 시험 방법이 표준화되어 있다.^{24,25)} 홍삼가수분해농축액의 인체첩포시험을 위하여 참여한 시험대상자는 총 32명으로, 평균연령은 만 47.3 ± 9.3세이었으며, 여성 32명, 남성 0명이었다. 시험시료 홍삼가수분해농축액은 20 µL를 패치에 로딩한 후 시험부위인 등 부위에 폐쇄첩포하고, 24시간 후에 제거하였다. 첩포 제거 30분 후 14명의 시험대상자에게서 판정점수 1의 피부반응, 2명의 시험대상자에게서 판정점수 3의 피부

반응이 관찰되었고, 24시간 후에는 7명의 시험대상자에게서 판정점수 1의 피부반응, 1명의 시험대상자에게서 판정점수 3의 피부반응이 관찰되었다. 48시간 후에는 9명의 시험대상자에게서 판정 점수 1의 피부반응이 관찰되었다. 무도포 부위의 경우에는 첩포 제거 30분, 24시간 및 48시간 후에 모든 시험대상자에게서 피부반응이 관찰되지 않았다. 상기의 육안평가 결과를 바탕으로, 평균 피부 반응도를 산정하였으며 피부 반응도 0.00~0.75는 무자극으로 판정하는 것에 따라 시험시료 홍삼가수분해농축액, 무도포 부위의 피부 자극도를 무자극으로 판정하였다(Table VI). 이상의 결과로부터 총 32명을 시험대상자로 한 인체 첩포시험에서 홍삼가수분해농축액은 '무자극 범주'에 해당하는 것으로 판단되었다.

결 론

소득 수준 향상 및 사회 발전에 따라 화장품 산업이 날로 발전하고 있어서 새로운 화장품 원료의 개발과 사용도 증가하고 있다. 고려인삼은 식의약품 원료로서 뿐만 아니라 화장품 원료로서도 가치가 높아지고 있다. 홍삼추출물에 펙티나아제로 생물전환하여 ginsenoside Rd를 강화한 표준화 소재 GS-E3D는 항산화 활성, 함염증 작용, 모발성장의 근원이 되는 모모세포의 증식 촉진 및 탈모를 유발하는 5α-reductase 발현 억제 효과 등이 밝혀지면서 탈모 방지용 화장품 소재로서 활용 가능성이 제시되어 피부 안전성 평가를 실시하였다. GS-E3D는 단회 경구투여 및 경피투여 독성시험에서 2,000 mg/kg 투여시에도 체중 변화 및 특이 증상이 발생하지 않았으며, 소각막을 이용한 안점막 자극시험과 인체피부모델을 활용한 피부자극시험에서 비자극성 물질로 평가되었으며, 마우스에 대한 피부감각시험에서 피부 감각이 나타나지 않았고, 인체를 대상으로 한 첩포시험에서도 무자극 물질로 평가되었다. 이상의 결과로부터 GS-E3D는 인체에 적용했을 때 안전한 물질로 확인되었으며, 화장품 소재로서 활용 가능한 것으로 판명되었다.

사 사

본 연구는 산업통상자원부와 한국산업기술진흥원이 지원하는 경제협력권산업 육성사업(No.R0005806)의 지원을 받아 수행된 연구결과이며 이에 감사드립니다.

인용문헌

- Im, K., Kim, J. and Min, H. (2016) Ginseng, the natural effectual antiviral: Protective effects of Korean red ginseng against viral infection. *J. Ginseng Res.* **40**: 309-314.
- Lee, N., Lee, S. H., Yoo, H. R. and Yoo, H. S. (2016) Anti-fatigue effects of enzyme-modified ginseng extract: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J. Altern. Complement Med.* **22**: 859-864.
- Hong, M., Lee, Y. H., Kim, S., Suk, K. T., Bang, C. S., Yoon, J. H., Baik, G. H., Kim, D. J. and Kim, M. J. (2016) Anti-inflammatory and antifatigue effect of Korean red ginseng in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J. Ginseng Res.* **40**: 203-210.
- Yuan, H. D., Kim, J. T., Kim, S. H. and Chung, S. H. (2012) Ginseng and diabetes: the evidences from in vitro, animal and human studies. *J. Ginseng Res.* **36**: 27-39.
- Lee, H. Y., Park, K. H., Park, Y. M., Moon, D. I., Oh, H. G., Kwon, D. Y., Yang, H. J., Kim, O., Kim, D. W., Yoo, J. H., Hong, S. C., Lee, K. H., Seol, S. Y., Park, Y. S., Park, J. D. and Pyo, M. K. (2014) Effects of pectin lyase-modified red ginseng extracts in high-fat diet-fed obese mice. *Lab. Anim. Res.* **30**: 151-160.
- Choi, J. G., Kim, N., Huh, E., Lee, H., Oh, M. H., Park, J. D., Pyo, M. K. and Oh, M. S. (2017) White ginseng protects mouse hippocampal cells against amyloid-beta oligomer toxicity. *Phytother. Res.* **31**: 497-506.
- Lee, S. E., Lee, S. U., Bang, J. K., Yu, Y. J. and Seong, R. S. (2004) Antioxidant activities of leaf, stem and root of *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Korean J. Med. Corp. Sci.* **21**: 184-190.
- Jiménez-Pérez, Z. E., Singh, P., Kim, Y. J., Mathiyalagan, R., Kim, D. H., Lee, M. H. and Yang, D. C. (2018) Applications of *Panaxginseng* leaves-mediated gold nanoparticles in cosmetics relation to antioxidant, moisture retention, and whitening effect on B16BL6 cells. *J. Ginseng Res.* **42**: 327-333.
- Pham, Q. L., Jang, H. J. and Kim, K. B. (2017) Anti-wrinkle effect of fermented black ginseng on human fibroblasts. *Int. J. Mol. Med.* **39**: 681-686.
- Lu, J.M., Yao, Q. and Chen, C. (2009) Ginseng compounds: an update on their molecular mechanisms and medical applications. *Curr. Vasc. Pharmacol.* **7**: 293-302.
- Seol, S. Y., Kim, B. R. Hong, S. C., Yoo, J. H., Lee, K. H., Lee, H. J., Park, J. D. and Pyo, M. K. (2014) The effective preparation of protopanaxadiol saponin enriched fraction from ginseng using the ultrafiltration. *Nat. Prod. Sci.* **20**: 58-64.
- Feng, L., Xu C., Li, Z., Li, J., Dai, Y., Han, H., Yu, S. and Liu, S. (2016) Microbial conversion of ginsenoside Rd from Rb1 by the fungus mutant *Aspergillus niger* strain TH-10a. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **46**: 336-341.
- Zeng, X., Li, J. and Li Z. (2015) Ginsenoside Rd mitigates myocardial ischemia-reperfusion injury via Nrf2/HO-1 signaling pathway. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **15**: 14497-14504.
- Zhang, Y. X., Wang, L., Xiao, E. L., Li, S. J., Chen, J. J., Gao, B., Min, G. N., Wang, Z. P. and Wu, Y. J. (2013) Ginsenoside-Rd exhibits anti-inflammatory activities through elevation of antioxidant enzyme activities and inhibition of JNK and ERK activation in vivo. *Int. Immunopharmacol.* **17**: 1094-1100.
- Li, Z., Li, J. J., Gu, L. J., Zhang, D. L., Wang, Y. B. and Sung C. K. (2013) Ginsenosides Rb? and Rd regulate proliferation of mature keratinocytes through induction of p63 expression in hair follicles. *Phytother. Res.* **27**: 1095-1101.
- Hong, S. C., Oh, M. H., Lee, H., Park, Y. S., Kim, N. Y., Park, S. H., Park, J. D., Jang, J. D., Kim, S. H., Kim, E. J. and Pyo, M. K. (2015) Pectinase-modified red ginseng (GS-E3D) inhibit NF- κ B translocation and nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **7**: 322-326.
- Pyo, M. K., Hong, S. C., Jung, J. T., Jo, Y. H. and Lee, K. M. (2017), Anti-oxidant and hair-growth-promoting effect of pectin lyase- modified red ginseng extract (GS-E3D). *Kor. J. Pharmacogn.* **48**: 195-201.
- Furukawa, M., Sakakibara, T., Itoh, K., Kawamura, K., Matsuura, M. and Kojima, H. (2017) Suggestion of the updated IVIS cut-off values for identifying non-ocular irritants in the bovine corneal opacity and permeability (BCOP) assay. *Toxicol. In Vitro* **45**: 19-24.
- Son, J. S. and Seo, Y. R. (2012) Review of Alternative Methods for the Safety Assessment of Cosmetic Ingredients: In Terms of Skin Irritation, Sensitization and Phototoxicity. *Cancer Prev. Res.* **17**: 270-279.
- Netzlaff, F., Lehr, C. M., Wertz, P. W. and Schaefer, U. F. (2005) The human epidermis models EpiSkin, SkinEthic and EpiDerm: an evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **60**: 167-178.
- Roguet, R., Cohen, C., Robles, C., Courtellemont, P., Tolle, M., Guillot, J. P. and Pouradier, D. X. (1998) An interlaboratory study of the reproducibility and relevance of EpiSkin, a reconstructed human epidermis, in the assessment of cosmetics irritancy. *Toxicol. In Vitro* **12**: 295-304.
- Avancini, J. and Zucchi, P. (2018) Prevalence of dermatoses in patients referred for evaluation in an outpatient clinic of specialties. *An Bras. Dermatol.* **93**: 513-516.
- Haneke, K. E., Tice, R. R., Carson, B. L., Margolin, B. H. and Stokes, W. S. (2001) ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay. Data analyses completed by the National Toxicology Program Interagency Center for the

- Evaluation of Alternative Toxicological Methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **34**: 274-286.
24. Lee, J. C., Sun, H. J. and Lee, H. Y. (2015) Biohazard surveillance of allergic contact dermatitis in genetically-modified *Zoysia* grasses using patch testing. *Allergy Asthma Respir. Dis.* **3**: 134-138.
25. Bergmann, M. M., Caubet, J. C., Boguniewicz, M. and Eigenmann, P. A. (2013) Evaluation of food allergy in patients with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* **1**: 22-28.
- (2018. 8. 6 접수; 2018. 9. 10 심사; 2018. 9. 12 게재확정)