

In vitro cytotoxicity에 의한

Draize score 측정 체계 수립

정민석, 최종완

한국화장품(주) 기술개발 연구소

The estimation of Draize score by *in vitro* cytotoxicity using continuous cell lines

M. S. Jung, J. O. Choi

Hankook cosmetics Co., Ltd. R&D Center

36-1 Samjeong-dong, Ojeong-gu Buchoen Kyeonggi-do, Korea

요 약

화장품의 변질요인은 크게 물리적 또는 화학적 변화에 의한 요인과 미생물오염으로 인한 각종 문제점으로 대별될 수 있다. 이 중에서 미생물 오염문제는 제품의 상품가치에 미치는 영향 뿐만 아니라 지속적인 사용에 의한 피부의 위생적 측면때문에 그 중요성에 대한 인식이 높아지고 있다. 따라서, 제품개발시는 화장품 처방중의 영양성분의 배합, pH, 유화형태, 방부제의 혼합, 분배 계수 및 그 안정성을 고려하여야 함은 물론이고 처방중의 모든 원료의 각각에 대한 항균능 및 피부자극여부를 사전에 미리 조사하여 각 제품별로 적당한 방부체계를 선택하는 것은 매우 중요한 일이다. 독성실험방법에 있어서 *in vivo* 실험에 대체할 수 있는 새로운 *in vitro* 실험방법 수립 즉, 동물실험을 하지 않고 *in vitro* 실험결과로부터 *in vivo* 결과를 예측할 수 있도록 새로운 *in vitro* 실험체계의 가능성을 실험하였다. 4종의 cell line중 transformed mouse fibroblast L929가 본 실험에서 사용하기에 배양상의 용이성과 안정성, 재현성의 관점에서 가장 알맞은 cell line이었다. transformed mouse fibroblast L929를 사용한 NR₅₀ assay와 Draize score간의 regression coefficient r 값은 0.91이었다. 혈청은 시험물질의 세포에 대한 민감성에 영향을 주었다.

따라서, modified serum-free method를 이용함으로써 regression coefficient가 증가된 즉, 상관성 및 재현성이 높은 결과를 얻을 수 있었다. 이러한 기술은 독성실험에 실험동물을 사용하지 않고 *in vivo* test에 대체 할 수 있고, 또한 화학물질에 대한 prescreening으로 이용할 수 있을 것으로 판단된다.

1. 서론

1944년 고안된 토끼눈을 이용한 Draize test는 화장품 원료와 personal care products(16)가 사람에게 있어서 발생할수 있는 각종 자극성을 미리 예상할 수 있는 방법으로 약 40년 동안 이용되어 왔다. 그러나, 이 방법은 비경제적이며 시간이 많이 소모되는 단점 이외에도 근래에는 동물 애호단체로부터 강력히 제재를 받는 실정으로 인하여 Draize test를 대신할 만한 다양한 *in vitro* alternative method가 연구되고 있다(1).

In vitro 방법은 동물 보호 차원의외에도 경제적이며 결과를 얻는데 소요되는 시간이 절약되는 점, 실험의 제어가 용이하다는 등의 장점으로 들 수 있다(2). 지금까지 개발된 *in vitro* 방법들은 그 대상에 따라 lower organism test, cell culture method, special cell culture method, organotypic method등으로 나눌 수 있으며(3-5), 이러한 방법들을 토대로 하여 EYETEX, MICROTEx, SKINTEX, CAMVA 등이 상품화 되어 있다(6-10). 하지만 이런 방법들도 개개의 한계점들을 가지고 있어서 앞으로도 지속적인 연구가 필요한 실정이다. 이들 방법중 배양된 세포를 이용한 방법은 실험동물들이 가지고 있는 종의 다양성 및 각 개체간의 차이성을 줄이는 동시에 한번에 대량으로 세포를 배양하여 사용함으로써 경제적이고 또 실험적인 오차를 줄일 수 있는 장점을 가지고 있다. 일차 배양(primary culture)된 human keratinocytes는 다른 동물의 조직이나 세포보다 사람의 눈에 대한 자극성실험을 대체하기에 적합하다. 그러나, 사람의 세포는 세포 근원의 다양성이나 불안정성 및 배양시의 난이점 등의 단점을 가지고 있어서 보편적으로 이용되지는 않는다. 만약, 실험이 분화된 세포의 특별한 기능을 요구하지 않는다면, 인간 세포는 쉽게 배양될 수 있는 animal continuous cell lines으로 대신할 수 있으므로 경제적으로 많은 양의 시료를 쉽게 적용하여 새로운 화장품 조성물을 미리 설계할 수 있다. 대부분의 세포배양을 이용하는 방법들은 시험물질을 적당한 농도로 희석하여 세포의 증식을 50% 저해하는데 해당하는 농도를 찾는 방식으로 이루어지며 endpoint측정방법은 주로 세포의 생존(viability)이나 증식(proliferation)정도를 나타내는 cloning efficiency, total protein content, neutral red uptake나 release, tetrazolium salt의 환원 등으로 측정된다(11-20).

본 논문에서는 계면활성제와 glycol 등의 화장품 원료물질의 세포독성을 continuous cell line을 통하여 측정할 수 있는 가능성을 조사하였다(21,22).

지금까지 일반적으로 사용되던 human keratinocyte나 primary rabbit cornea cell(6) 대신에 배양조건이 잘 알려진 continuous cell line 4종을 대상세포로 하여 이미 Draize score가 알려져 있는 계면활성제와 glycol류의 독성을 neutral red법(neutral red uptake)을 이용하여 측정하였다. 측정결과는 각 물질의 Draize score와 비교하여 상관계수(r)로 표시하였다.

2. 실험재료 및 방법

1. 세포주 및 시약

1-1. 세포주

Normal human fibroblast는 5% fetal bovine serum이 함유된 DMEM, Chinese hamster ovary(CHO-KI)는 5% bovine calf serum이 함유된 RPMI, human fibrosarcoma(HT-1080)와 transformed mouse fibroblast L929는 5% bovine calf serum이 함유된 DMEM에 5% CO₂ 및 37°C조건으로 배양하였다. 배양된 세포는 80% confluent시에 DMEM 또는 RPMI로 세척한 후 trypsinization(0.25%)에 의하여 세포를 회수하였다.

1-2. 계면활성제 및 glycols

실험에 사용된 비이온, 음이온, 양이온계면활성제와 glycols는 Table 1과 같이 Draize score도 함께 나타내었다. 이러한 화학물질들은 유화제 또는 보습제로 화장품 및 세제에 첨가되는 것들로 PBS에 녹여 0.22 μ m MF-millipore filter로 제균한 후 배지로 희석하여 사용하였다.

2. 세포자극 측정방법

2-1. Neutral red assay에 의한 세포농도 측정

Trypsinization에 의하여 회수한 세포를 2% serum이 함유된 배지로 희석한 후 96 well tissue culture plate의 각각의 well에 세포 현탁액(2500-3000 cells/well) 90 μ l를 접종한 다음, 37°C에서 5% CO₂조건으로 2일간 배양하였다. 배양 후 새로운 배지 90 μ l로 교체하였고 여기에 10 μ l의 시험물질로 처리한 후 2일간 배양하였다. 배양이 끝나면 각 well에 100 μ l의 neutral red solution(50 μ g/mL)을 첨가하여 3시간 동안 반응 시켰다. neutral red가 완전한 plasma membrane을 통과하여 살아있는 세포 또는 손상받지 않은 세포의 lysosome에 농축된 후, 1.0% formalin/1.0% CaCl₂ 100 μ l로 처리한 다음 1.0% acetic acid/50% ethanol solution을 사용하여 세포내의 neutral red를 추출하였다. 추출된 neutral red는 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 측정하였다.

2-2. Serum-free culture(modified)

Serum내에 존재하는 많은 구성물들에 의한 실험결과의 변수를 줄여 동물실험과의 상관성을 높이기 위하여 무혈청배지를 조사하였으나, L929에 대한 무혈청배지가 알려지지 않아 변형된 방법을 사용하였다. 즉, 96 well microplate에 세포를 접종하여 37°C에서 5% CO₂

조건으로 2일간 배양 후, transferrin(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)과 ethanolamine(50 $\mu\text{M}/\text{mL}$)이 함유된 DMEM/F10(1:1) 무혈청배지로 교체하여 세포를 2일 동안 시험물질로 처리하였다. 처리한 후의 시험법은 2-1과 동일하다.

Table 1. List of test chemicals

Chemical	*DS 20(w/w %)
<u>Nonionic surfactant</u>	
Polyoxyethylene sorbitan monooleate	50
Polyoxyethylene sorbitan monolaurate	>100(200)
Polyoxyethylene lauryl ether	4
Polyoxyethylene nonyl phenyl ether	5
Cocconut fatty acid diethanolamine	11
<u>Anionic surfactant</u>	
Sodium N-lauryl-L-glutamate	13.5
Sodium lauryl sarcosinate	7
Sodium lauryl sulfate	4.5
Sodium N-acyl-L-glutamate	4
Sodium N-cocoyl-L-glutamate	11
<u>Cationic surfactant</u>	
Stearyl trimethyl ammonium chloride	2.2
<u>Other</u>	
Glycerin	>100(400)
Polyethylene glycol 400	>100(280)
1,3-Butylene glycol	>100(224)
Propylene glycol	>100(625)

* : Torishima H. et.al AATEX 1,20(1990) “ Application of normal human epidermal keratinocytes in serum-free medium as an alternative to the Draize ocular irritating test.”

3. In vivo patch test

3-1. 실험 재료

3-1-1. 시험 대상

대조군 : 정상 성인여성 23명.

시험군 : 화장품에 의한 접촉피부염으로 진단된 성인여성 32명.

3-1-2. 시험 시료 : 화장품 제조에 사용되는 ingredient 40종(Table 8)

3-2. 실험 방법

3-2-1. 첩포시험 : 대조군과 시험군에서 공히 시험물질을 Scanpor tape에 부착된 Finn chamber를 사용하여 첩포하고 48시간 후에 첩포물질을 제거하고 피부를 acetone으로 세척한 30분 후와 첩포 96시간 후 2회에 걸쳐 피부반응을 판독 하였다.

3-2-2. 첩포결과 판독 : 첩포시험 반응의 판정은 International contact dermatitis research group 기준을 적용하였다.

3. 결과 및 고찰

1. 시험물질 투여시기의 결정

각 실험 세포주의 생육곡선을 구하여 시험물질 첨가에 적합한 시기를 결정하였다. Fig. 1에 의하면 4개의 세포주 모두 4일째까지 총 세포수가 증가하고 그 이후에는 감소하였는데, 신뢰할 수 있는 결과를 얻기 위해서는 시험물질을 세포가 활발히 성장하는 시기에 첨가해야 하므로 2일째 되는 날 시험물질을 투여하고 4일째 되는 날 생존도를 측정하였다.

2. Cell line의 선택

3종의 continuous cell line인 transformed mouse fibroblast L929, Chinese hamster ovary 및 human fibrosarcoma와 1종의 normal cell인 human fibroblast는 세포독성실험을 위해 적절한 cell line으로 선택하여 실험하였다. 선택의 지침은 NR₅₀ assay와 Draize test간의 상관관계로 결정하였으며, 4종의 다른 cell line에 대한 10가지의 시험물질의 세포 독성은 Fig. 2와 같다. transformed mouse fibroblast L929와 Chinese hamster ovary 는 시험물질 독성에 대하여 인간 세포보다 더 민감하였다. 이러한 결과로 부터 NR₅₀값(세포의 생존율이 50%에 달하는 시험물질의 농도)은 계산할 수 있고, 그 결과는 Table 2, Fig. 3과 같았다. Fig. 3은 각 세포주에서 구한 NR₅₀과 Draize score 20과의 상관관계를 나타낸 그래프로 여기에서 구한 직선식의 regression coefficient (γ)가 1에 가까울수록 Draize test와의 상관성이 높다고 볼 수 있으며 4종의 세포주로부터 구한 관계식 및 coefficient γ 값은 transformed mouse fibroblast L929는 $\gamma=0.82$ ($y=1.47x + 1.32$), Chinese hamster ovary는 $\gamma=0.83$ ($y=0.94x + 1.52$), Human fibroblast는 $\gamma=0.69$ ($y=1.3x + 1.26$), Human fibrosarcoma는 $\gamma=0.74$ ($y=0.77x + 1.58$) 이었다.

Chinese hamster ovary 는 본 실험에서 약간의 불안정성을 가지고 있는 것으로 나타나 transformed mouse fibroblast L929를 본 실험에 적당한 cell line으로 선택하였고, 또한 transformed mouse fibroblast L929의 regression coefficient γ 값은 human keratinocyte를 실험 하였을 때 얻은 $\gamma=0.83$ 과 비슷한 값을 얻었다.

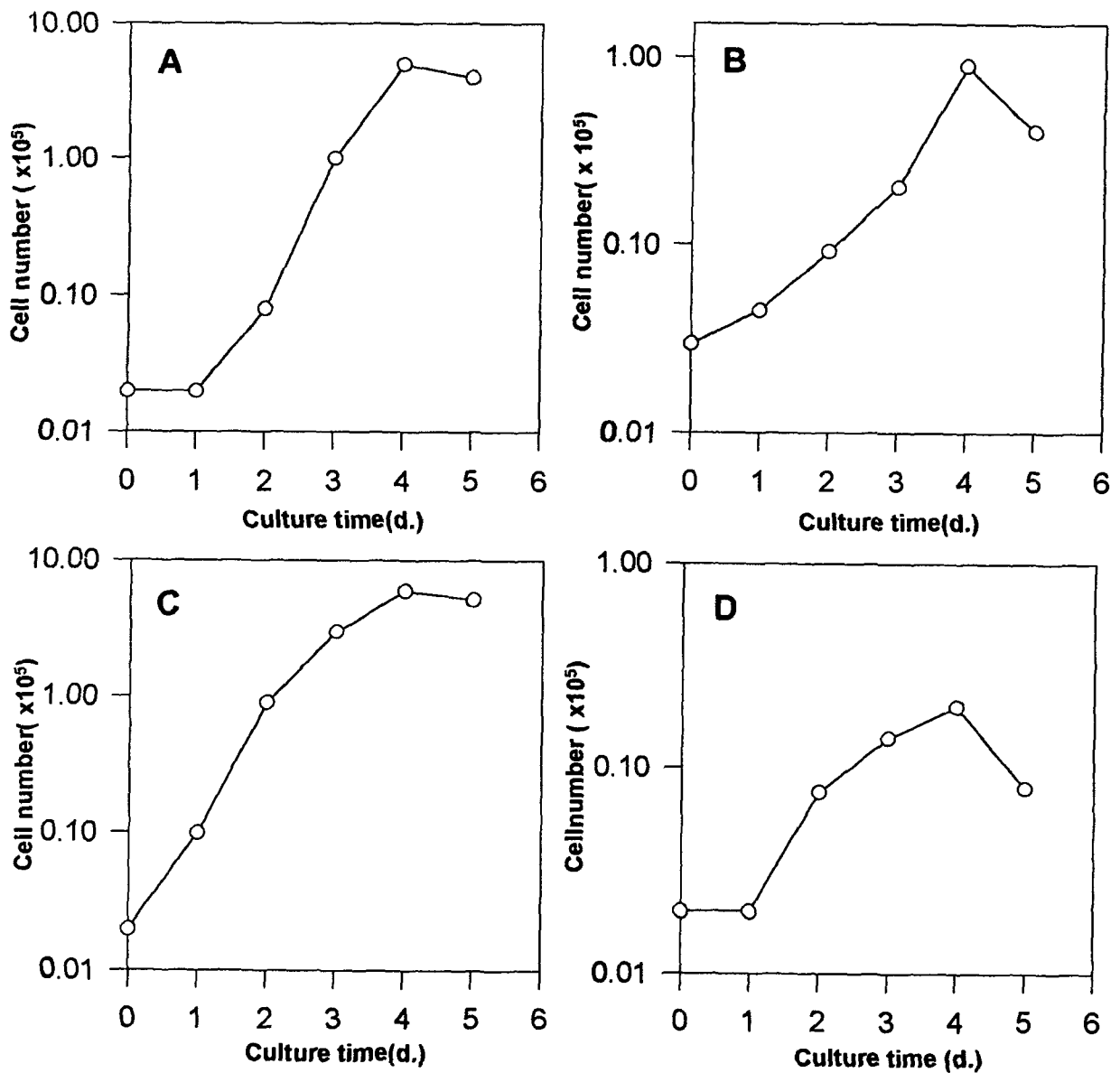


Fig. 1. Growth curves of various cell lines

A : L929, B : CHO, C : Human fibrosarcoma, D : Human fibroblast.

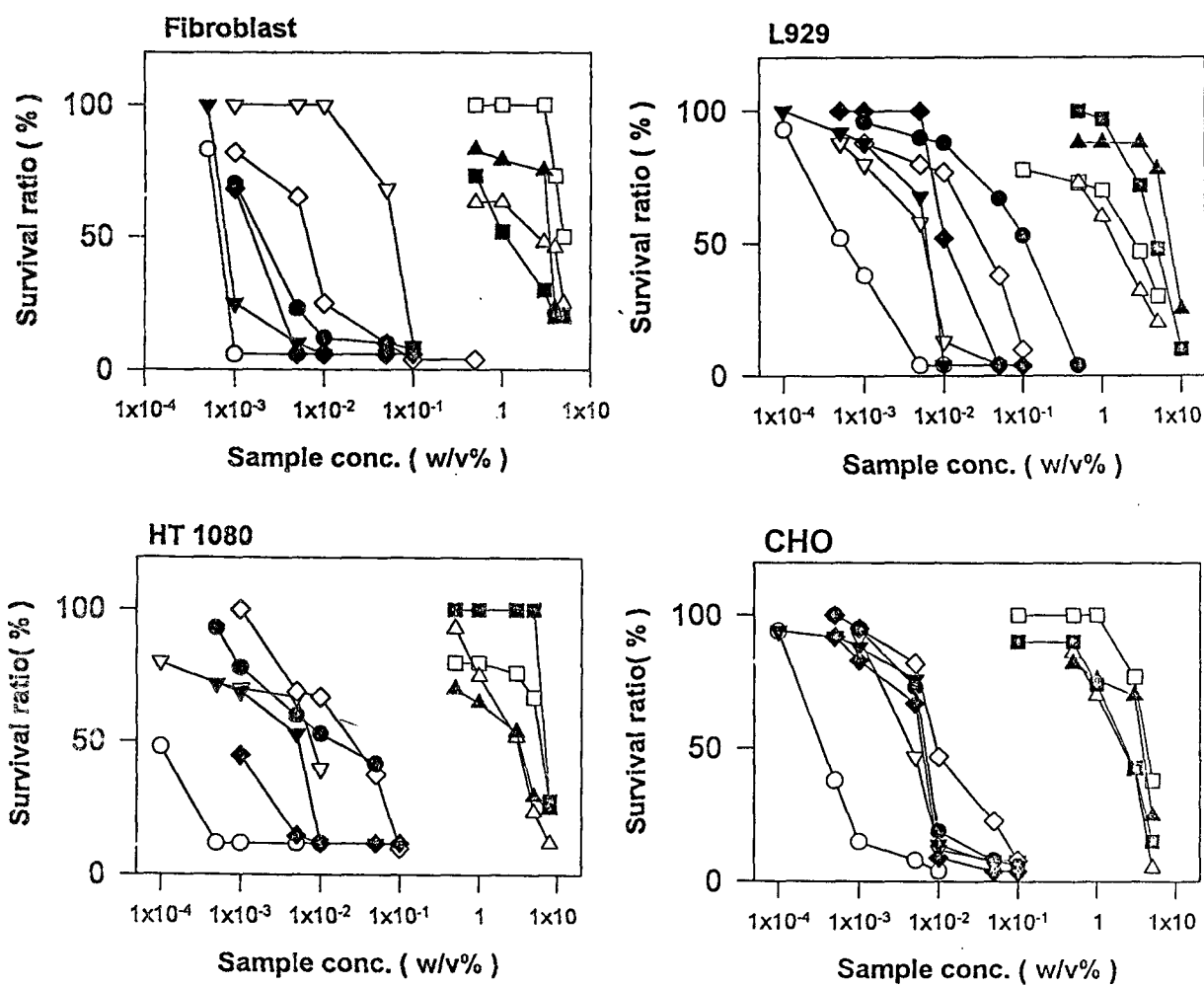


Fig. 2. Cytotoxicity measurement by various cell lines.

- ◇ Polyoxyethylene sorbitan monooleate, ◆ Polyoxyethylene sorbitan monolaurate,
- Coconut fatty acid diethanolamide, ● Sodium N-lauryl L-glutamate,
- ▽ Sodium lauryl sarcinate, ▼ Sodium lauryl sulfate, □ Glycerin, ■ PEG 400,
- △ 1,3-Butylene glycol, ▲ Propylene glycol

Table 2. NR₅₀ score of 10 chemicals for different cell lines

Chemical	NR ₅₀ × 10 ⁵ (log)				DS 20 (log)
	L929	CHO	HT 1080	Fibloblast	
Polyoxyethylene sorbitan monooleate	3.4	2.8	3.3	2.8	1.7
Polyoxyethylene sorbitan monolaurate	3.0	2.8	1.9	2.2	2.3
Cocconut fatty acid diethanolamine	1.8	1.5	0.9	2.0	1.04
Sodium N-lauryl-L-glutamate	3.7	2.8	3.1	2.3	1.13
Sodium lauryl sarcosinate	2.8	2.6	2.3	3.9	0.85
Sodium lauryl sulfate	2.8	2.8	2.8	2.1	0.65
Glycerin	5.3	5.5	5.6	5.6	2.6
Polyethylene glycol 400	5.2	5.2	5.8	-	2.45
1,3-Butylene glycol	5.0	5.2	5.0	5.0	2.35
Propylene glycol	5.4	5.4	5.3	5.2	2.8
Regression coefficient(γ)	0.82	0.83	0.74	0.69	1.0

3. 실험결과에 대한 재현성

세포를 오랜 기간동안 배양 할 경우 발생될지도 모르는 시간에 대한 세포의 재현성을 확인하기 위해 2달간격으로 같은 실험을 3번 반복하였고, 그 결과는 Table 3과 같다. 이와 같은 결과로 NR₅₀에 대한 안정성 및 재현성을 확인하였다. γ 값이 큰 변동이 없이 모두 0.8을 상회하는 것으로 나타나 Torishima 연구진이 정상표피세포 NHEK를 이용하여 실험한 경우($\gamma = 0.83$)와 유사한 값을 보였다(21).

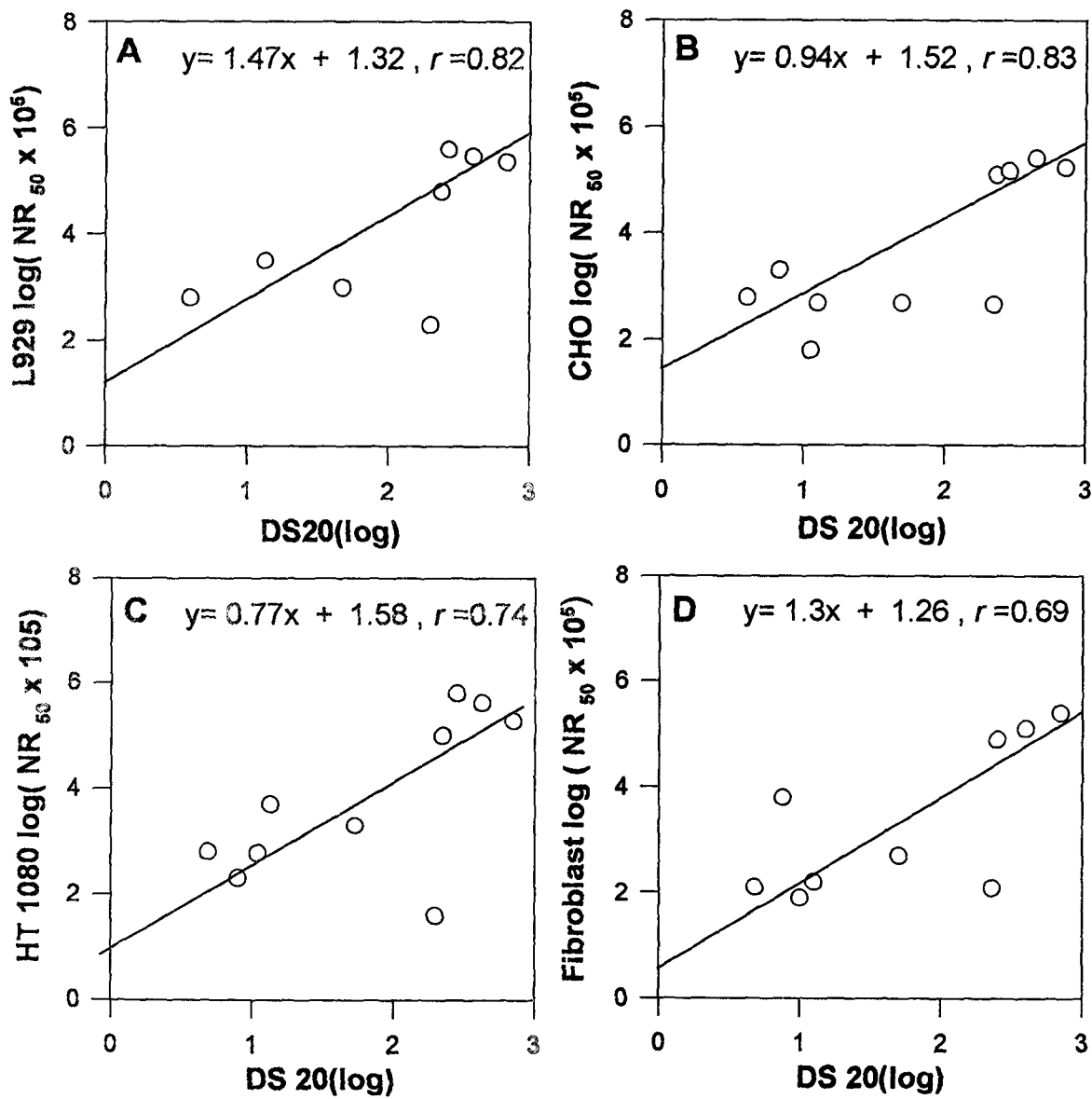


Fig. 3. The coefficients of correlation between NR₅₀ and DS 20.

A : L929, B : CHO, C : human fibrosarcoma, D : human fibroblast

Table 3. Time dependent change of NR₅₀ score for L929

Chemical	L929 NR ₅₀ x 10 ⁵ (log)		
	1st	2nd	3rd
Polyoxyethylene sorbitan monooleate	3.40	3.00	3.20
Polyoxyethylene sorbitan monolaurate	3.00	2.94	2.85
Cocconut fatty acid diethanolamine	1.80	1.74	1.80
Sodium N-lauryl-L-glutamate	3.70	3.70	3.30
Sodium lauryl sarcosinate	2.80	2.90	2.60
Sodium lauryl sulfate	2.80	2.78	2.50
Glycerin	5.30	5.51	5.40
Polyethylene glycol 400	5.20	5.25	5.22
1,3-Butylene glycol	5.00	5.08	5.22
Propylene glycol	5.40	5.20	5.12
Regression coefficient(γ)	0.82	0.81	0.83

4. 혈청에 대한 영향

일차적인 실험에서 배지에 혈청의 농도를 5.0%에서 1.0%로 감소시켰을 때 regression coefficient γ 값이 점점 증가하는 값을 얻었다. 따라서, modified serum free method를 통하여 15종의 시험물질을 측정하였고, 그 결과는 Table 4와 같이 regression coefficient γ 값은 0.91이었다. 또한 이 결과와 Draize test와의 상관관계는 Fig. 4와 같았다. 이와 같은 결과로 세포독성실험에 동물을 사용하지 않고 Draize score를 측정하는데 본 실험이 유용하다고 사료된다.

Table 4. NR₅₀ scores of 15 chemicals on correlation between serum case and serum-free case

Chemical	L929 Log(NR ₅₀ x 10 ⁵)	
	2.0%	0%
<u>Nonionic surfactant</u>		
Polyoxyethylene sorbitan monooleate	3.20	2.50
Polyoxyethylene sorbitan monolaurate	2.93	2.58
Polyoxyethylene lauryl ether	1.74	1.03
Polyoxyethylene nonyl phenyl ether	1.72	1.13
Cocconut fatty acid diethanolamine	1.78	1.37
<u>Anionic surfactant</u>		
Sodium N-lauryl-L-glutamate	3.40	2.81
Sodium lauryl sarcosinate	2.77	2.52
Sodium lauryl sulfate	2.69	1.43
Sodium N-acyl-L-glutamate	2.35	1.42
Sodium N-cocoyl-L-glutamate	3.40	2.49
<u>Cationic surfactant</u>		
Stearyl trimethyl ammonium chloride	1.25	0.53
<u>Other</u>		
Glycerin	5.40	5.50
Polyethylene glycol 400	5.22	5.32
1,3-Butylene glycol	5.10	5.35
Propylene glycol	5.24	5.20
Regression coefficient	0.88	0.91

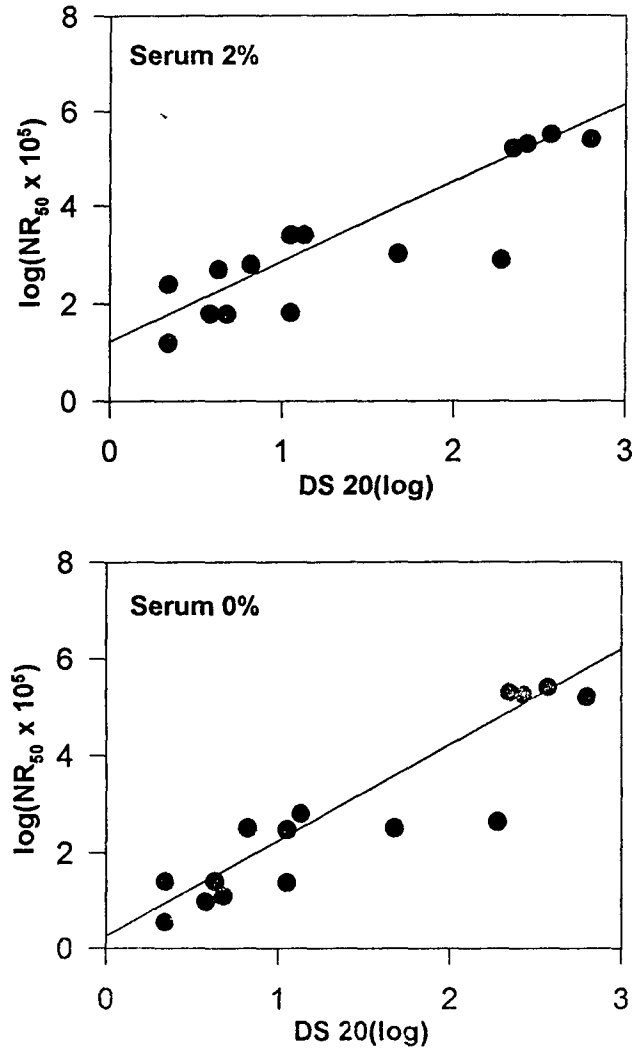


Fig. 4. The regression curve representing the correlation between the NR₅₀ method using L929 and Draize test.

5. 여러 가지 시험물질에 대한 본 실험방법의 적용

앞에서 행한 실험결과를 토대로 상관 관계식이 정해지면 DS 20값을 모르는 미지의 시료에 대해서도 NR₅₀ 값을 구함으로써 DS 20값을 예측할 수 있다.

5-1. 방부제의 자극성 실험

화장품에 첨가되는 방부제 G-115, G-II, N-M, N-P, N-B, kathon-CG, bronopol의 자극성 정도를 앞에서와 동일한 방법(NR₅₀ 값)으로 조사하였다. 시료는 PBS에 녹여 배지에 희석하여 사용하였으며 결과는 Table 5와 같다.

NR₅₀ 값으로 부터 계산된 방부제의 DS 20값은 1에서 50사이에 비교적 넓게 분포하였으며, 이러한 결과로 보아 이들은 앞서 실험하였던 10가지 시료중 주로 음이온 계면활성제와 비슷한 자극성을 가지는 것으로 추정된다. 그 중 특히 N-P와 N-B가 두 세포주에서 모두 자극성이 높은 것으로 나타났고, 반면에 G-115와 G-II 그리고 bronopol의 경우에는 자극성이 낮은 것으로 보인다. 참고로 DS 20값이 100이상일 경우 자극성이 거의 없는 것으로 볼 수 있다.

Table 5. NR₅₀ score of preservatives for L929

	NR ₅₀ ×10(log)	예상 DS 20 ¹			평균값	평균식으로 부터 구한 값 ²
		1차	2차	3차		
G-115	3.8	38.0	33.1	49.0	40±6.65	43.65
G-II	3.4	21.4	19.1	25.7	22.07±2.74	23.99
N-M	2.3	4.7	4.3	4.7	4.57±0.19	4.57
N-P	2.0	3.1	2.9	2.9	2.97±0.09	2.95
N-B	2.0	3.1	2.9	2.9	2.97±0.09	2.95
Kathon-CG	2.5	6.1	5.6	6.3	6.00±0.29	6.17
Bronopol	3.4	21.4	19.1	25.7	22.07±2.74	23.99

¹ : 예상 DS 20는 3개의 regression equation에 방부제의 NR₅₀ 값을 대입하여 얻은 것임.

² : 3차까지의 실험으로 부터 평균 관계식 $y = 1.54x + 1.28$ 을 구하고 이로부터 구한 DS 20 값임.

5-2. 로션의 자극성 측정

Table 6과 같이 방부제 Nipa-M과 비이온 계면활성제 polysorbate 60의 조성을 달리한 로션시료를 위의 방법으로 L929에 대해 NR₅₀ 값을 구함으로써 자극성을 측정하였다. L929를 이용한 실험결과는 Table 7에 있으며, 이들 시료의 DS 20값은 10과 20 사이에 분포하였다. 즉, 방부제 Nipa-M과 계면활성제 polysorbate 60이 가장 많이 첨가된 시료인 F-5의 예상 DS 20값이 10.73으로 가장 낮고, 그 다음이 방부제의 조성이 약간 다른 F-4로 12.4로 나타났으며, 그 다음이 F-2, F-3, F-1의 순서로 나타나 계면활성제의 자극성이 방부제의 자극성을 앞서는 것으로 보인다.

이상의 결과로부터 transformed mouse fibroblast L929를 이용하여 각 성분의 DS 20값을 결정할 수 있음은 물론이고 로션과 같은 혼합물의 DS 20값도 계산이 가능하였다.

Table 6. Formula of lotion samples

	F-1	F-2	F-3	F-4	F-5
Pure water	66.48	66.38	66.98	66.38	65.18
Nipa-M	0.1	0.2	0.2	0.3	0.4
EDTA-2Na	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
1,3-BG	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Carbopol #941 (2% sol'n)	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00
Pure water	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
T.E.A	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Stearic acid	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20
Cetanol	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
Polysynlane	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00
Cutina CBS	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Polysorbate 60	1.00	1.00	0.50	1.00	2.00
Arlacel #80	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50

Table 7. The NR₅₀ score of lotions for L929

	NR ₅₀ × 10 ⁵ (log)	예상 DS 20 ¹			평균값 ± S.D	평균식으로 부터 구한 값 ²
		1차	2차	3차		
F-1	3.3	18.6	16.6	22.4	19.2 ± 2.41	20.4
F-2	3.1	14.1	12.6	15.8	14.17 ± 1.31	15.1
F-3	3.3	18.6	16.6	22.4	19.2 ± 2.4	20.4
F-4	3.0	12.3	11.2	13.8	12.4 ± 1.07	15.1
F-5	2.9	10.7	9.7	11.8	10.73 ± 0.86	11.2

¹ : 예상 DS 20는 3개의 regression equation에 방부제의 NR₅₀값을 대입하여 얻은 것임

² : 3차까지의 실험으로 부터 평균 관계식 $y = 1.54x + 1.28$ 을 구하고 이로 부터 구한 DS 20 값임.

6. *In vivo* patch test 결과

Draize score값을 실질적으로 제품관리에 이용하기 위하여 patch test를 이용한 결과와 Draize score값의 일치여부를 알아보기 위하여 화장품 제조에 사용되는 40종의 화장품 성분에 대한 자극정도를 23명의 정상 대조군과 임상적으로 화장품에 의한 접촉 피부염으로 진단된 환자 32명을 대상으로 첩포시험한 결과는 Table 8과 같이 나타났다.

1. 화장품 성분에 대하여 23명의 정상 대조군중 3명이 반응을 보였다.

반응내용은 glycyrrhетinate에 대하여 의양성 1명, 약양성 1명, 1,3-butylene glycol에 대하여 의양성 1명이였다.

2. 32명의 환자중 한가지 이상에 반응을 보인 사람은 14명 이였다.

3. 정상 대조군에게 자극반응을 나타낸 물질은 2종이였으며 접촉 피부염 환자에게 자극반응을 나타낸 물질은 20종이였다.

4. 자극반응을 나타낸 물질은 주로 계면활성제와 방부제로 Table 7에서와 같이 계면활성제의 자극성이 방부제의 자극성을 앞서는 것으로 확인되였다.

5. 자극반응이 가장 높게 나타난 물질은 glycyrrhетinate로 정상 대조군 2명, 피부 접촉염 환자 9명에게 반응을 나타냈다.

6. Patch test를 이용한 임상실험 결과와 Draize score값간의 상관성에 있어서 일치하지 않은 성분은 1,3-butylene glycol이였다.

Table 8. The analytical data on patch test

No.	Ingredient	Conc (%)	Women					
			Control(23)			Patient(32)		
			±	+	++	±	+	++
1	DEA-cetyl phosphate(Amphisol NP)	10						
2	Cetyl palmitate	10					1	
3	Squalane							
4	Tocopheryl acetate							
5	Xanthan gum	2				1		
6	Glycerine							
7	Glyceryl stearate & PEG-100 stearate (Arlacel #165)	10					1	
8	Sucrose palmitate(Crodesta S-50)	10					2	
9	Carboxy vinyl polymer	2				1		
10	PEG-20 glyceryl monostearate (Cutina E-24)	10					1	
11	Glyceryl monostearate(GMS-A)	10						
12	Behenyl alcohol	10						
13	Mineral oil							
14	Perilla extract							
15	Multifunctional peptide complex	1						
16	Placentol						1	1
17	Dimethicone							
18	Potassium cetyl phosphate	10						
19	1,3-Butylene glycol		1			2	5	
20	Glycyrrhetinate(Glycy-P(T))	10	1	1			9	
21	Polyoxyethylene glycol(11) Nonyl phenyl ether						1	
22	Polyoxyethylene glycol(60) Hydrogenate castor oil	10						
23	Egg york oil						1	

(to be continued)

No.	Ingredient	Conc (%)	Women					
			Control(23)			Patient(32)		
			±	+	++	±	+	++
24	Isopropyl myristate	20					2	
25	Amerchol L 101						1	
26	Triethanolamine	2					1	
27	Polyoxyethylene sorbitan momooleate (TW #80)	5					1	
28	Sorbitan monooleate(Span #80)	5						
29	2,6-Ditert-butyl-4-cresol	2						
30	Triclosan(Irgasan DP300)	2						
31	Imidazolidinyl urea	2					1	1
32	Chlorhexidine digluconate	0.5						
33	Paraben	3				1	1	
34	Sorbitan sesquioleate (Arlacel #83)	20				2	1	
35	Propylene glycol	5						
36	Cetyl alcohol	5						
37	2-Brono-2-nitropropane-1,3-diol (Bronopol)	0.25						
38	Cocamidopropyl betaine	1				1	4	
39	Cl+Me-Isothiazolinone (Kathon CG, 200ppm)	0.02					1	
40	Quaternium 15(Dowicil 200)	1						

4. 결론

1. 4종의 cell line을 실험한 결과 이 중 transformed mouse fibroblast L929가 본 실험에서 사용하기에 배양상의 용이성과 안정성, 재현성의 관점에서 가장 알맞은 cell line이었다.
2. Transformed mouse fibroblast L929를 사용한 NR₅₀ method과 Draize score간의 regression coefficient γ 값은 0.91로 normal human epidermal keratinocyte를 이용한 경우($\gamma = 0.83$) 보다 높은 상관성을 나타내었다. 이와같은 결과로 보아 세포독성실험에 동물을 사용하지 않고 Draize score를 예측하는데 본 실험이 유용하다고 판단된다.

3. 혈청은 시험물질의 세포에 대한 민감성에 영향을 주었다. 따라서, modified serum-free method를 이용함으로써 regression coefficient가 증가된 즉, 상관성이 높은 결과를 얻을 수 있었다.
4. 이러한 기술은 독성실험에 실험동물을 사용하지 않고 *in vivo* test에 대체 할 수 있고, 또한 시험물질에 대한 prescreening으로 이용할 수 있을 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

1. Gilman, M.R. 1982. Skin and eye testing in animal. Principles and methods of toxicology. *Raven Press*. pp 209-222.
2. Benford, D.J. 1992. The use of animal cells as replacements ofr whole animals in the toxicity testing of chemicals and pharmaceuticals. *Animal cell biotechnology*, vol 5. Academic Press. pp 97-121.
3. Fentem, J. and M. Balls. 1992. Strategies in non-animal testing. *Cosm. & Toil.* 200-204.
4. Silber, P.M. and C.E. Ruegg. 1992. Product safety: In vitro assays. *Cosm. & Toil.* 107: 71-78.
5. Gettings, S.D. 1992. Update on in vitro alternatives development. *Cosm. & Toil.* 107: 71-80.18. Clonetics Corp., 9620 Chesapeake Dr., Suite 206, San Diego, CA 92123-1324 USA.
6. Clonetics Corp., 9620 Chesapeake Dr., Suite 206, San Diego, CA 92123-1324 USA.
7. Marrow-Tech., 10933 N. Torrey Pines Rd., La Jolla, CA 92037 USA.
8. Organogenesis Inc., 83 Rogers st., Cambridge, MA 02142 USA
9. Bagley, D.M., B.B. Kong and S. De Salva. 1989. Assessing the eye irritation potential of surfactant-based materials using the chorioallantoic membrane vascular assay (CAMVA). In: *Altermative Methods in Toxicology*, vol 7. Goldberg, A.M. eds. New York: Mary Ann Liebert, Inc. pp 265-272.
10. Gordon, V.C., C.P. Kelly and H.C. Bergman. 1989. Applications of the EYTEX method for determination of the ocular irritation of surfactant formulations. In: *Alternative Methods in Toxicology*, vol 7. Goldberg, A.M. eds. New York: Mary Ann Liebert, Inc. pp 337-345.
11. Shopsis, C. and B. Eng. 1988. *In vitro* ocular irritancy prediction: Assays in serum free media correlate better with *in vivo* date. *Altern. Methods Toxicol.* 6: 253-264.

12. Silber, P.M. 1991. Selection and utilization of in vitro toxicity tests. *Cosm. & Toil.* 106(4): 55-62.
13. Silverman, J. and S. Pennisi. 1985. *Tetrahymena thermophila* (30377) as an indicator of ocular irritancy in rabbits. In: *Alternative methods in Toxicology*; vol 3. Goldberg, A.M. eds. New York: Mary Ann Liebert, Inc. pp 673-680.
14. Ribo, J.M. and K.L.E. Kaiser. 1987. *Photobacterium phosphoreum* toxicity bioassay; test procedures and applications. *Toxicity Assessment 2*: 305-323.
15. Triglia, D., S. Sherard Braa, C. Yonan and G.K. Naughton. 1991. Cytotoxicity testing using neutral red and MTT assays in a three-dimensional human skin substrate. *Toxicol. In Vitro.* (in press).
16. Borenfreund, E. and J. Puerner. 1984. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). *J. Tissue Culture Meth.* 9(1): 7-9.
17. Triglia, D., S. Sherard Braa, C. Yonan and G.K. Naughton. 1991. In vitro toxicity of various classes of test agents using the neutral red assay on a human three-dimensional physiologic skin model. *In Vitro Cell Develop. Biol.* 27A: 239-244.
18. Mosmann, R. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: applications to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immuno. Meth.* 65: 55-63.
19. Cooper, J.A., R. Saracci and P. Cole. 1979. Describing the validity of carcinogen screening tests. *British J. Cancer.* 39: 87-89.
20. Triglia, D., S. Sherard Braa, T. Donnelly, I. Kidd and G.K. Naughton. A 3-dimensional human dermal model substrate for *in vitro* toxicological studies. In: *Alternative Methods in Toxicology*, vol 8. Goldberg, A.M. eds. New York: Mary Ann Liebert, Inc. (in press).
21. Torishima, H., H. Arakawa and S. Matsui. 1990. Application of normal human epidermal keratinocytes in serum-free medium as an alternative to the Draize ocular irritation test. *AATEX 1*, pp 20-26.
22. Babich, H., N.M. Alguacil and E. Borenfreund. 1985. Comparison of the cytotoxicities of dermatotoxicants to human keratinocytes and Fibroblasts in vitro. *In Vitro Toxicol.* 5: 153-167.