

Glycolic Acid에 대한 토끼와 기니픽간의 피부자극성 비교

안광수 · 정경미 · 김용규 · 이종권 · 박기숙 · 김은정 · 이선희 · 홍진태*
식품의약품안전청 국립독성연구소

Comparison of Skin Response Between New Zealand White Rabbit and Hartley Guinea Pig to Glycolic Acid

Kwang Soo Ahn, Kyoung Mi Jung, Young Kyu Kim, Jong Kwon Lee, Ki Sook Park,
Eun Joung Kim, Sun Hee Lee and Jin Tae Hong*

Department of Toxicology, National Institute of Toxicology Research, Korea Food and
Drug Administration, 5 Nokbun-Dong, Eunpyung-Ku, Seoul, 122-704, Korea
(Received March 30, 2001)
(Accepted April 14, 2001)

ABSTRACT: In this study, we compared skin response between Hartley guinea pig and New Zealand white rabbit. New Zealand white rabbit was treated by a glycolic acid (0, 8, 24, 40, 56 mg/cm²) and UVB (0, 0.4, 3.0 J/cm²) for 14 days. Skin irritation by glycolic acid and UVB were increased in dose and time-dependent manners, and the combination treatment of UVB increased glycolic acid-induced skin irritation. Comparison the skin irritation index between guinea pig and rabbit showed that guinea pig was much more sensitive to glycolic acid and UVB. This study indicated that selection of reliable species of animal could be considered in chemical-induced skin irritation study.

Key Words: Skin irritation, Rabbit, Guinea Pig, Glycolic acid

I. 서 론

독성시험의 하나인 국소독성시험은 피부자극성과 안점막자극성시험(식약청고시, 1999)으로 구분되며, 외용 및 점안의약품이나 화장품과 같이 피부 및 점막에 적용하는 여러 물질들의 적용부위에 대한 독성을 평가하는데 이용된다. 본 연구에서는 국소독성시험 중 토끼를 이용한 피부자극시험에 준하여 누적피부자극시험을 실시하여 시간에 따른 피부자극을 확인하고, 토끼 외에 기니픽에 대한 피부자극지수와 비교하여 실험동물 종간의 차이를 알아보았다. 피부독성 시험은 New Zealand white rabbit을 이용하여 국립독성연구소 SOP의 NITR/SOP/LTX에 준하여 14일간

의 누적피부자극시험을 실시하였다. 시험물질로는 자외선(UVB)(Rivas 및 Ullrich, 1994; Holly 및 Hononavara, 1997) 0.4, 3.0 J/cm²과 화장품의 원료로 많이 이용되는 α -hydroxy acid(AHA)의 하나인 glycolic acid(pH 3.0) (Harald and Daniel, 1996; Chun and Chung, 1997) 0, 8, 24, 40, 56 mg/cm²를 농도별로 처리하였으며, 피부자극지수는 평점표(Table 1)에 따랐다. 토끼에서 glycolic acid 농도별 단

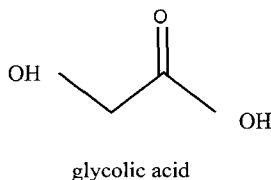


Fig. 1. The structure of glycolic acid.

Table 1. Scoring criteria for estimation of skin irritation

Erythema and eschar formation		Edema formation	
Criteria	Explain	Criteria	Explain
0	None	0	None
1	Very slight erythema	1	Very slight edema
2	Moderate erythema	2	Moderate edema (edges of area well-defined by definition raising)
3	Severe erythema	3	Moderate to severe edema (raised approximately 1 mm)
4	Severe erythema and slight eschar formation	4	Severe edema (raised more than 1 mm and extending beyond area of exposure)

*To whom correspondence should be addressed

독 처리군과 UVB 병행 처리군에 대한 피부자극지수를 비교하고, glycolic acid에 의한 기니픽의 피부자극지수와 비교하여 두 종간의 차이를 살펴보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

피부자극실험을 위해 2.5~3.0 kg의 New Zealand white계 토끼 12마리를 수령하여 1주일간 순화기간을 두었다. 알루미늄 합금제로 된 480 mm×610 mm×450 mm의 사육상자에 한 마리씩 수용하였으며, 실내온도 22±2°C, 상대습도 50±20%, 12시간 명암주기의 사육조건을 유지하였으며 특이한 외형상의 문제점이 나타나지 않는 동물만 시험에 사용하였다. 사료는 토끼용 고형사료를, 음수는 상수도수로 매일 제공하여 자유롭게 섭취하도록 하였다.

2. 피부자극시험

표준작업지침서(SOP) 활용 피부독성시험의 일환으로 New Zealand white rabbit을 이용하여 NITR/SOP/LTX에

준하여 14일간의 누적피부자극시험을 실시하였다. 특이한 외형상의 문제점이 나타나지 않는 동물만 선택하여 토끼의 등 중앙을 10×15 cm²로 1차 제모하고 24시간 후에 2차 제모한 후 2.5×2.5 cm²씩 4개의 구획을 표시하였다. 2차 제모 후 피부를 안정화시킨 다음, 실험군 당 UVB(312 nm)를 30 cm의 거리에서 0, 0.4, 3.0 J/cm²의 농도별로 조사하고(Ananthaswamy *et al.*, 1997), 증류수에 녹인 glycolic acid를 0, 8, 24, 40, 56 mg/cm²의 농도가 되게 500 μl씩 도포하였다. 투여기간은 총 14일로 매일 투여하고 24시간 이 지난 후 피부를 관찰하여 자극정도를 기록하였다. 자외선은 UVB(290~320 nm)를 조사량별로 쪼여주었으며, UVB 조사를 위한 UV등은 F40M UVB lamp가 부착된 RMX 3 W lighter(Dong Sung Lab. Tech., Seoul, Korea)를 사용하였으며, 빛의 강도는 VLX-312 sensor가 부착된 VLX-3W radiometer로 측정하여 0.4, 3.0 J/cm²로 조사하였다. 판정은 홍반, 가피 및 부종 등을 국립독성연구소 표준작업지침서의 피부자극성 평점표(Table 1)에 따라 측정하였다.

3. 통계처리

회귀곡선 및 상관계수는 Sigmastat 프로그램(Version

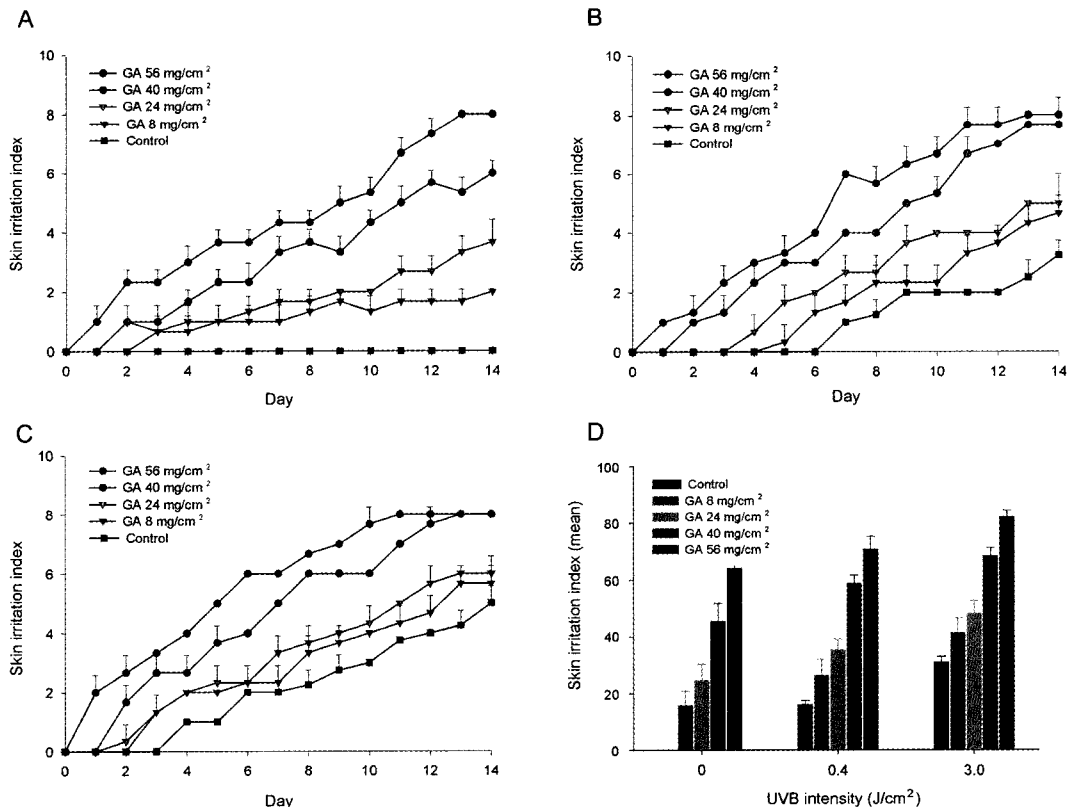


Fig. 2. Skin irritation index in rabbit treated with different concentration of glycolic acid and UVB for 14 days. A; glycolic acid + UVB 0 J/cm², B; glycolic acid + UVB 0.4 J/cm², C; glycolic acid + UVB 3.0 J/cm², D; glycolic acid = UVB.

2.03, Jandal Scientific Co. USA)을 이용하여 구하였다.

III. 결 과

1. 토끼를 이용한 누적자극시험

Glycolic acid를 증류수에 녹여 14일간의 누적자극시험을 실시하였다. Glycolic acid의 농도를 10%, 30%, 50%, 70%가 되게 만든 다음 각 농도당 4군데의 2.5x2.5 cm² 부위에 500 μl씩 도포하여 cm²당 glycolic acid의 도포량을 0, 8, 24, 40, 56 mg이 되게 하였다. 증류수만 도포한 부위는 피부자극이 전혀 없는 것으로 나타났으며, 8 mg/cm²의 glycolic acid를 도포한 부위는 14일째 피부자극지수가 2.0, 24 mg/cm²의 glycolic acid 농도에서는 3.7, 40 mg/cm²에서는 6.0, 56 mg/cm²에서는 8.0으로 glycolic acid의 농도가 높아짐에 따라 피부자극지수(skin irritation index)도 높아졌다(Fig. 2A). UVB 0.4 J/cm²과 glycolic acid 농도별로 병행처리하였을 경우, 증류수를 도포한 부위는 피부자극지수가 3.3, 8 mg/cm²의 glycolic acid를 도포한 부위는 14일째 피부자극지수가 4.7, 24 mg/cm²의 glycolic

acid 농도에서는 5.0, 40 mg/cm²에서는 7.7, 56 mg/cm²에서는 8.0으로 glycolic acid의 농도가 높아짐에 따라 피부자극지수도 높아졌다(Fig. 2B). UVB 3.0 J/cm²과 glycolic acid 농도별로 병행처리하였을 경우, 증류수를 도포한 부위는 피부자극지수가 5.0, 8 mg/cm²의 glycolic acid를 도포한 부위는 14일째 피부자극지수가 5.7, 24 mg/cm²의 glycolic acid 농도에서는 6.0, 40 mg/cm²에서는 8.0, 56 mg/cm²에서는 8.0으로 glycolic acid의 농도가 높아짐에 따라 피부자극지수도 높아졌다(Fig. 2C). 14일간의 누적피부자극지수에 대하여 비교해 본 결과, glycolic acid와 UVB를 병행처리하였을 경우 glycolic acid 단독처리군에 비해 UVB 조사량에 의존적으로, 그리고 glycolic acid의 농도에 의존적으로 피부자극지수가 증가됨을 볼 수 있었다(Fig 2D).

2. 토끼와 기니픽의 피부자극도 비교

Glycolic acid의 도포량을 0, 8, 24, 40, 56 mg/cm²로 14일간 매일 처리하여 얻은 토끼의 피부자극지수와 기니픽의 피부자극지수(Jin Tae Hong, 2000)를 농도별로 상관성을 비교하였다. 상관계수는 투여날짜를 독립변수로 두고

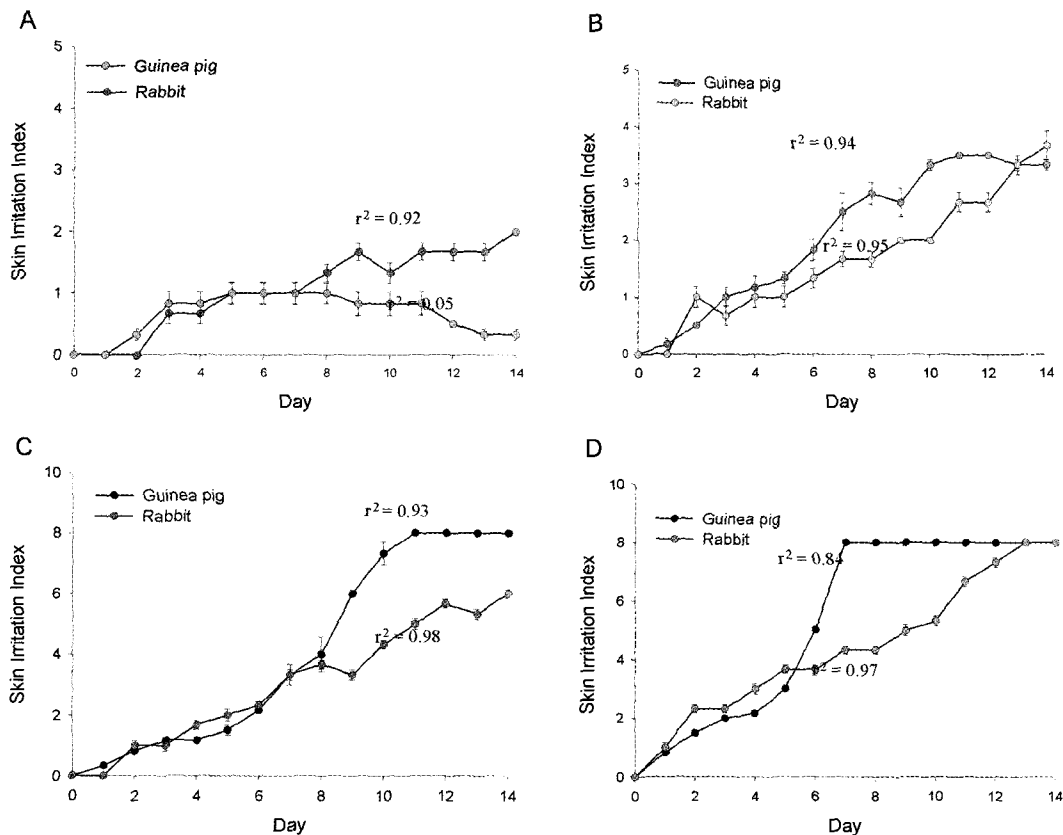


Fig. 3. Comparison of skin irritation index between rabbit and guinea pig treated with different concentration of glycolic acid for 14 days. A; glycolic acid 8 mg/cm², B; glycolic acid 24 mg/cm², C; glycolic acid 40 mg/cm², D; glycolic acid 56 mg/cm².

중속변수를 피부자극지수로 놓고 산점도(scatter diagram)를 그려 산출하였다. Glycolic acid를 8 mg/cm²로 도포하였을 때 상관계수가 기니픽의 경우 $r^2=0.05$, 토끼의 경우 $r^2=0.92$ 로 산출되었으며(Fig. 3A), 24 mg/cm²의 농도로 도포하였을 때 기니픽이 $r^2=0.94$, 토끼의 경우 $r^2=0.95$ 로 산출되었고(Fig. 3B), 40 mg/cm²로 도포하였을 때 기니픽이 $r^2=0.93$, 토끼의 경우 $r^2=0.98$ (Fig. 3C), 56 mg/cm²로 도포하였을 때 기니픽이 $r^2=0.84$, 토끼의 경우 $r^2=0.97$ 로 산출되었다(Fig. 3D). Glycolic acid 각 농도에서 실시된 피부자극시험은 기니픽 보다는 토끼를 이용한 피부자극시험에서 직선성이 좋게 나타났다. 또한 glycolic acid의 농도별로 14일간의 피부자극 지수에 대한 분포도(distribution)를 그려본 결과 기니픽에서 보다 토끼에서 투여기간에 따른 피부자극 지수가 일정하게 증가되는 양상을 볼 수 있었으며, glycolic acid의 농도에 대해서도 일정하게 증가되는 양상을 볼 수 있었다(Fig. 4A). 그리고 기니픽과 토끼의 누적자극시험 결과에서 14일째의 피부자극지수로 상관계수를 구한 결과 기니픽이 $r^2=0.89$, 토끼가 $r^2=0.99$ 로

산출되었다(Fig. 4B).

IV. 고 찰

국소독성시험 중 토끼를 이용한 피부자극시험을 실시하여 기니픽에서 얻은 피부 반응 정도와 비교하여 동물간 차이를 밝히고자 glycolic acid와 자외선 중 312nm인 UVB를 시험물질로 선정하여 *in vivo* 시험으로 토끼를 이용한 14일간의 누적자극시험을 실시하였다.

Glycolic acid에 대하여 농도별로 피부자극성을 평가하기 위하여 토끼의 등 부위에 14일간 매일 glycolic acid를 농도별로 도포하여 관찰한 결과, glycolic acid의 투여기간 및 농도에 의존적으로 홍반, 부종, 가피 등의 지표들이 많이 관찰되었으며 피부자극지수도 증가하였다. 자외선 중 지구상 생물체에 피부암 및 피부자극을 일으키는 주원인으로 알려져 있는 UVB(312 nm)(Ananthaswamy, 1997)의 피부자극성을 평가하기 위하여 조사량별로 토끼의 등 부위에 14일간 매일 처리한 결과, UVB의 조사량에 의존적으로 피부자극지수가 증가하였다. 또한 피부자극을 일으키는 glycolic acid와 UVB를 병행처리하여 실험한 결과, glycolic acid나 UVB 단독처리 군에 비해 심한 부종 및 가피 등을 관찰되어 피부자극지수가 증가하였다. 농도 및 pH에 따라 피부 자극을 일으키는 물질로 알려진 glycolic acid는 UVB와 병용처리시 glycolic acid에 의한 피부자극은 주로 피부의 홍반 및 가피가 주로 일어나며 부종과 염증반응을 크게 일으키지 않는다는 것이 다른 피부 자극 물질 12-*o*-tetradecanoylphorbol-13-acetate(TPA) 등과 다르다. UVB와 병용처리시 UVB에 의한 부종과 염증 발생도 증가시키지 않는점으로 봐서 glycolic acid의 피부 자극은 주로 홍반·가피이며 낮은 농도에서 stratum corneum의 빠른 재생은 손상된 피부의 회복에 좋은 것으로 판단된다. 그러나 고농도로 장시간 처리시 epidermis 및 dermis까지 염증을 동반하지 않는 구조적 파괴를 일으키는 것으로 알려져 있어 주의를 요한다. 따라서 glycolic acid의 화장품에 사용시 적절한 자외선 차단제와 병용하여 사용하는 것이 UVB에 대한 피부손상을 막을 수 있겠다. 실제로 glycolic acid는 UV에 의한 Sunburn cell 형성을 촉진시키는 것으로 보도되고 있다(Position paper concerning the alpha-hydroxy acid of the scientific committee on cosmetic products and non-food product contended for consumers).

또한 glycolic acid에 의한 토끼 및 기니픽에서 반응한 피부자극지수를 비교하여 실험동물 종간의 차이에 대하여 살펴보고자 glycolic acid를 농도별로 14일간 처리하여 피부자극시험을 수행한 결과, 기니픽에서는 7일 정도 이후에 급격히 피부자극이 증가되는 경향을 보였으나 토끼에서는

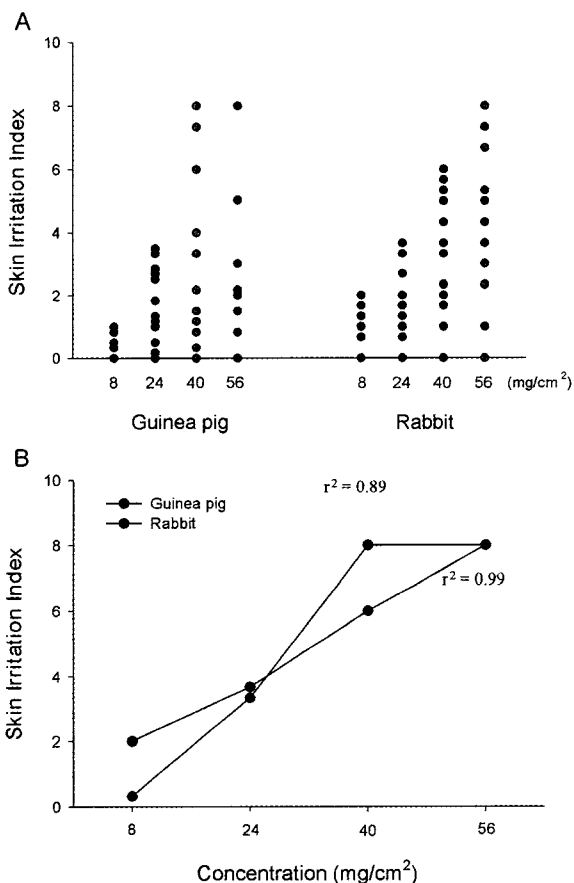


Fig. 4. Comparison of correlation coefficient of the skin irritation index between rabbit and guinea pig treated with different concentration of glycolic acid for 14 days. A; distribution of skin irritation index every day, B; correlation coefficient at 14 day.

일정한 경향으로 피부자극지수가 14일까지 지속적으로 증가되었다. 또한 glycolic acid의 처리 농도를 변화하였을 때 피부자극지수의 변화를 비교해 본 결과, 기니픽에서 반응한 최대피부자극지수에 도달하는 glycolic acid의 농도가 토끼의 경우 최대피부자극지수에 도달하는 농도보다 낮은 것으로 관찰되었다. 이상에서와 같이 투여기간 및 투여농도에 대한 피부자극지수의 변화가 토끼보다 기니픽에서의 심한 것으로 나타났으며, 이는 연속투여에 대한 피부 자극이 토끼보다는 기니픽에서 민감한 것으로 사료된다.

농도에 따른 피부자극지수에 대한 상관계수는 피부자극지수가 14일까지 지속적인 상관관계로 나타내므로 토끼의 실험결과가 기니픽의 실험결과 보다 좋았으며, 피부자극도 기니픽에서 훨씬 민감함이 관찰되었다. 따라서 자극성이 약한 시험물질에 대하여 피부자극시험을 실시할 경우 피부자극이 민감한 기니픽을 이용하여 피부자극시험을 수행하는 것이 적당할 것으로 생각되며, 약 2주 정도로 장시간 처리해야하거나 자극이 강한 시험물질에 대해서 추천되고 있는 토끼를 이용하여 피부자극시험을 실시하는 것이 적당하리라 사료된다.

V. 결 론

New Zealand White Rabbit을 이용하여 glycolic acid 및 UVB에 의한 피부자극시험을 연구하였다. Glycolic acid (pH 3.0)는 0 mg/cm², 8 mg/cm², 24 mg/cm², 40 mg/cm², 56 mg/cm²의 농도별로 14일간 도포하였으며, UVB(312 nm)는 각각 0 J/cm², 0.4 J/cm² 및 3 J/cm²로 조사하여 glycolic acid 단독처리군과 UVB의 조사량별 병행처리군에 대한 피부자극을 비교하였다. 피부자극 판정표에 따라 피부자극지수를 구한 결과, glycolic acid의 농도가 높아짐에 따라 홍반, 부종, 가피 등의 피부자극도가 증가하였으며, UVB를 병행처리한 군에서는 UVB의 조사량에 비례하여 glycolic acid 단독처리 군에 비해 피부자극이 증가하였다.

또한 토끼와 기니픽에 glycolic acid와 UVB를 조사하여 피부자극도를 비교한 결과, 기니픽이 토끼보다 glycolic acid나 UVB에 민감한 것으로 나타났다. 기니픽은 낮은 농도에서 짧은 기간투여시에도 피부 자극을 보인 반면 토끼는 높은 농도 장기간 노출시 피부 자극이 나타남으로써 피부자극시험시 동물선택은 화학물질 등의 자극정도와 투여기간에 따라 중차이를 고려해야 할 것으로 판단된다.

참고문헌

- Ananthaswamy, H.N., Loughlin, S.M., Cox, P, Evans, R.L., Ullrich, S.E. and Kripke, M.L. (1997): Sunlight and skin cancer: Inhibition of p53 mutations in UV-irradiated mouse skin by sunscreens. *Nat. Med.*, **3**, 510-514.
- Chun, M.W. and Chung, L.H. (1997): The effects of glycolic acid on the treatment of acne in Asian skin. *Dermatol. Surg.*, **23**, 23-29.
- Harald, B. and Daniel, P. (1996): Round table discussion of alpha hydroxy acid. *Dermatol. Surg.*, **22**, 475-477.
- Holly, S. and Hononavara, N. (1997): Mechanism of induction skin cancer by UV radiation. *Frontier in Bioscience*, **2**, 538-551.
- Jin Tae Hong, Wung Hoon Kim, Ki Sook Park, Seung Rel Ryu, Hye Jin Kim, Hyung Su Kim, Hong Kwon Lee, Ki Taek Nam, Dong Deuk Jang, Sun Hee Lee, Pu Young Kim and Dae Hyun Cho (2000): Skin Irritation Effect of Glycolic Acid and UVB in Guinea Pig, *J. Toxicol. Pub. Health*, **16**(1), 89-94.
- Rivas, J.M. and Ullrich, S.E. (1994): the role of IL-4, IL-10 and TNF- α in the immune suppression induced by ultraviolet radiation. *J. Leucocyte Biol.*, **56**, 769-774.
- US Food and Drug Administration, FDA background, July 3, 1997.
- 국소독성시험, 의약품등의 독성시험기준, 식약청 고시 1999-61호, 52-55, 1999.