



국소 림프절 시험법(Local lymph node assay)을 이용한 피부미백화장품 원료의 피부감작성 연구

이종권 · 박승희 · 박재현 · 김형수 · 엄준호 · 남기택 · 한범석 · 장동덕 · 최광식 · 오혜영
식품의약품안전청 국립독성연구원 특수독성부

Evaluation of Skin Sensitization Potential of Skin Whitening Agents by Local Lymph Node Assay

Jong Kwon Lee, Seung Hee Park, Jae Hyun Park, Hyung Soo Kim, Jun Ho Eom, Ki Taek Nam,
Beom Seok Han, Dong Deuk Jang, Kwang Sik Choi and Hye Young Oh

Department of Specialized Toxicology, National Institute of Toxicological Research,
Korea Food and Drug Administration, Seoul 122-704, Korea

Received September 22, 2003; Accepted October 22, 2003

ABSTRACT. The use of skin whitening agents has been recently increased in various kinds of cosmetic products, although there were some reports that whitening agents might cause allergic contact dermatitis. A murine local lymph node assay (LLNA) has been developed as an alternative to guinea pigs for contact sensitization potential. This study was carried out to investigate the skin sensitization potential of three whitening agents, arbutin, azelaic acid, and kojic acid, by LLNA using a non-radioisotopic endpoint. Female Balb/c mice were exposed topically to a weak allergen, α -hexylcinnamaldehyde (HCA), and three whitening agents following LLNA protocol. Lymph node (LN) weight and cell proliferation in ears and auricular lymph node using bromodeoxyuridine (BrdU) immunohistochemistry were evaluated. LN weights were significantly increased at the HCA group compared to the vehicle control. A weak allergen, HCA elicited 3-fold or greater increase in cell proliferation of lymph nodes as well as increase in cell proliferation of ear as measured by BrdU immunohistochemistry. However, in the case of skin whitening agent groups, there were no significant changes in LN weight and cell proliferation in the ear and lymph node of mice treated with 5, 10 and 20% of three whitening agents compared to the vehicle control. These results show that these three skin whitening agents may not have contact sensitization potentials at tested concentrations in Balb/c mice by LLNA.

Keywords: Skin whitening agents, BrdU, Immunohistochemistry, Local lymph node assay.

서 론

최근 화장품에 대한 소비자의 요구가 다양해지면서 자외선 차단, 주름제거, 미백 등 특정한 기능을 목적으로 하는 기능성 화장품의 생산 및 보급이 급속도로 확산되고 있어 이에 대한 안전성 평가가 요구되고 있다. 그 중 피부 미백 화장품의 경우는 멜라닌 색소 형성을 억제시키거나

각질세포를 벗겨내어 멜라닌 색소를 제거하는 등의 작용을 하는 것으로서 피부의 생리에 영향을 미칠 수 있으며 (Maeda와 Fukuda, 1991; Maeda와 Fukuda, 1996; Chakraborty 등, 1998), 미백화장품의 원료중에서 인체에 알레르기성 접촉 피부염을 일으킬 수 있다는 보고가 있어 미백화장품원료에 대한 피부감작성시험 평가의 필요성이 제기되고 있다(Nakagawa 등, 1995; Serra-Baldrich 등, 1998).

자외선의 작용으로 피부에 생기는 기미와 주근깨 등의 색소 침착은 멜라닌 합성세포인 melanocyte에서 과잉생산된 멜라닌 색소의 피부침착에 기인한다(Iwata 등, 1990;

Correspondence to: Jong Kwon Lee, Department of Specialized Toxicology, National Institute of Toxicological Research, Korea Food and Drug Administration, 5 Nokbun-Dong, Eunpyung-Gu, Seoul 122-704, Korea
E-mail: jkleest@kfda.go.kr

Pavel, 1993). 멜라닌은 melanocyte의 melanosome에서 tyrosinase가 tyrosine을 산화하여 DOPA를 생성하여 DOPA quinone을 거쳐 연속적인 산화작용에 의해 만들어진다(Hearing과 Tsukamoto, 1991; Pavel, 1993). 따라서 미백화장품원료의 주기전은 멜라닌 색소형성에 가장 중요한 tyrosinase을 억제하는 물질로서 kojic acid, arbutin, azelaic acid 등이 사용되고 있다(Maeda와 Fukuda, 1996; Curto 등, 1999).

화학물질에 대한 피부 감작성시험은 전통적으로 기니픽을 사용한 동물모델이 이용되어 왔는데(Botham 등, 1991), 그 중에서도 면역보조제를 이용하는 GPMT(Guinea Pig Maximization Test) 시험과 면역보조제를 사용하지 않는 Buehler 시험이 가장 보편적으로 사용되고 있다(Buehler, 1965; Magnusson과 Kligman, 1969). 최근 화장품 업계를 중심으로 동물시험을 가급적 지양하려는 움직임과 동물실험의 대체(replacement), 실험규모 및 실험기간의 단축(reduction), 실험방법의 증진(refinement)이라는 소위 '3Rs' 운동이 전세계적으로 펼쳐지고 있다(EC, 1999). 이러한 흐름속에서 화학물질의 피부감작성 시험평가지 기니픽을 사용한 시험은 되도록 지양되고, 동물수를 줄이려는 대체시험법의 요구가 높아지면서 마우스를 이용한 local lymph node assay 방법(LLNA)이 OECD 독성시험 가이드라인에 상정되어 있다(OECD, 2002). LLNA는 화학물질을 마우스 귀에 도포하고 이개 림프절(auricular lymph node)에서의 증식반응을 3H-thymidine uptake으로 평가하는 방법으로 1986년 Kimber 등에 의해 소개된 이래, 여러 시험자에 의해 이 방법이 연구되고 있다(Basketter와 Scholes, 1992; Kimber 등, 1995; Loveless 등, 1996; Kimber 등, 1999; Lee 등, 2002a). 그러나 이 시험 방법은 방사선 동위원소를 사용하기 때문에 취급이 용이하지 않고 특별한 시설이 필요하여 국내에서 사용하기에는 쉽지 않을 뿐만 아니라, 강한 자극성 물질을 도포하였을 때 알러젠과 유사한 반응이 나타난다는 보고도 있다(Sikorski 등, 1996; Basketter 등, 1998; Gerberick 등, 1999; Lee 등, 2002a). 이러한 단점을 보완하고자 본 연구진(Lee 등, 2002b)은 비방사선 시험방법을 이용한 LLNA 시험방법에 대한 연구로, 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)를 이용하여 림프절에서 면역조직화학기법(immunohistochemistry)을 이용하는 방법이 유용하다고 보고하였다.

본 연구는 피부미백화장품 원료인 arbutin, azelaic acid, kojic acid 3종과 양성대조군으로서 미약한 알러젠인 α -hexylcinnamaldehyde(HCA)에 대하여 비방사선을 이용한 LLNA시험방법으로 피부감작성 평가를 하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물

실험동물은 암컷 Balb/c 마우스를 식품의약품안전청 국립독성연구원으로부터 공급받아 1주일간 순화기간을 둔 후 6~8주령의 건강한 동물을 선택하여 사용하였다. 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였으며 온도 23±2°C, 습도 55±10%, 12시간 명암주기의 사육조건을 유지시켰으며, 동물은 케이지당 4마리를 수용하였다. 동물은 AAALAC (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care) 기준에 맞게 관리하였다.

시험물질

피부미백화장품 원료로 kojic acid(Sigma, USA), arbutin (Sigma, USA), azelaic acid(Aldrich, USA), 그리고 약한 알러젠으로 HCA(Sigma Chemical Co., USA)를 사용하였다. 용매로는 예비실험을 통해서 kojic acid, arbutin, azelaic acid에 대해서는 dimethylformide(DMF)를 사용하였고, HCA는 acetone과 olive oil를 4 : 1로 섞은 AOO (4 : 1 acetone/olive oil)를 사용하였으며, 기타 시약은 특급을 사용하였다.

실험 방법

LLNA 시험: LLNA 시험은 통상적인 시험방법대로(Lee 등, 2002a) 실시하였는데 간단히 요약하면 다음과 같다. 시험물질을 예비실험을 통해 얻은 결과를 참고로 하여 각 용량별로 25 μ l씩 마우스 양쪽 귀 배측에 조금씩 분할도포 하여 시험물질이 정량적으로 흡수되도록 하였으며, 군당 4마리씩 1일 1회 3일 동안 연속해서 도포하여 감각시킨 후 2일 후에 부검을 실시하였다.

BrdU 투여 및 장기의 처리: 예비실험을 통해 얻은 결과를 통해 부검하기 2시간 전에 BrdU를 체중 kg당 100 mg으로 복강 주사하였다. 부검후에 이개 림프절의 중량을 측정하고, 귀 및 림프절을 통상적인 방법대로 중성 포르말린에 고정한 후, 파라핀 포매하여 H&E 염색을 실시하였다.

BrdU 면역조직화학염색 및 알러젠 판정: BrdU 면역조직화학염색은 Lee 등(2002b)의 방법대로 실시하였는데, 간단히 요약하면 다음과 같다. 파라핀 제거과정을 거친후 proteinase K를 처리하고 2 N HCl을 가하였다. 내재된 peroxidase를 봉쇄하기 위하여 3% 과산화수소를 상온에서 30분간 가하였다. Blocking serum을 상온에서 20분간 가한 후에 anti-BrdU 항체(Beckton Dickson, USA)를 60분간 배양시켰다. 조직에 biotinylated 2차 항체를 가하고 streptavidin peroxidase에 배양하였다. 기질로는

diaminobenzidine(Sigma, USA)를 사용하여 발색시키고, 대조염색은 hematoxylin으로 하여 광학현미경으로 관찰하였다. 귀에서 BrdU labelling index(LI)는 각기의 표피에서 100개의 세포 당 BrdU 양성세포수로 계산하였다. 림프절의 세포증식반응은 각기의 표준화된 장소(피질, 방피질, 수질)에서 100개의 세포당 BrdU 양성세포수를 BrdU LI로 하여 측정하였다. 알려진 유무의 판정은 Lee 등(2002b)의 방법에 따라 림프절에서 증식반응을 BrdU LI로 구하고 대조군과 비교하여 피질과 수질에서의 SI(stimulation index)가 3 이상인 것을 양성으로 판정하였다.

Ear thickness 측정: Ear thickness는 부검일에 귀의 두께를 Lee 등(2003a)의 방법대로 다음과 같이 실시하였다. 귀의 두께는 한사람이 맹검법으로 micrometer(Digital Caliper, Mututoyo Co., Japan)를 사용하여 마우스의 귀를 세 번 반복 측정하여 구하였다.

통계처리

본 실험에 대한 자료의 분석은 통계처리 프로그램인 Sigma stat(Version 2.03, USA)를 사용하여 유의수준 $\alpha=0.05$ 이하로 하고 분산분석(analysis of variance)을 실시한 후에 Dunnett's t-test를 이용하여 비교하였다(Gad와 Weil, 1994).

결 과

체중 및 장기 중량의 변화

미백화장품 원료인 arbutin, azelaic acid, kojic acid와 약한 알러젠인 HCA를 투여하여 체중변화를 관찰한 결과, 화장품 원료와 알러젠 도포는 마우스에 유의적인 체중증감을 유도하지 않았다(Table 1).

Arbutin, azelaic acid, kojic acid, HCA를 도포한 후의 이개 림프절의 중량 변화를 Fig. 1에 나타내었다. 림프절의 상대중량은 대조군(DMF), 5% arbutin, 10% arbutin, 20% arbutin에서 각각 0.41, 0.42, 0.44, 0.37 g/kg으로 나타나 대조군에 비해 용량별로 1.0, 1.1, 0.9배의 변화를 보였다. Azelaic acid군의 경우 대조군, 5%, 10%, 20%에서 각각 0.32, 0.32, 0.27, 0.24 g/kg으로 나타나 대조군에 비해 용량별로 1.0, 0.8, 0.8배의 변화를 보였다. Kojic acid군의 경우 대조군, 5%, 10%, 20%에서 각각 0.41, 0.35, 0.38, 0.45 g/kg으로 나타나 대조군에 비해 용량별로 0.8, 0.9, 1.1배 변화하였다. 그러나 HCA군에서는 저용량, 중용량에서 림프절의 유의성 있는 증가를 관찰할 수 있었다(Fig. 1). HCA군의 상대중량은 대조군(AOO), 20%, 30%, 40%에서 각각 0.42, 0.67, 0.76, 0.76 관찰

Table 1. The change of body weight in mice treated with arbutin, azelaic acid, kojic acid, and HCA

Treatment	Body weight (g)		Percent change of B.W.
	day 0	day 5 ^{a)}	
DMF	21.0±0.6	21.0±1.0	98.1±1.7
5% Arbutin	21.3±0.7	20.5±0.7	96.0±0.5
10% Arbutin	22.9±0.7	21.9±0.8	95.4±2.1
20% Arbutin	21.5±0.7	21.0±0.8	97.6±3.4
DMF	20.9±0.4	20.4±0.7	97.9±1.8
5% Azelaic acid	20.7±0.9	20.1±0.7	97.1±1.6
10% Azelaic acid	21.1±0.6	20.6±0.7	97.5±1.0
20% Azelaic acid	21.7±1.3	20.8±1.3	96.2±1.7
DMF	21.0±0.6	21.0±1.0	98.1±1.7
5% Kojic acid	21.6±0.6	20.4±0.7	94.5±2.1
10% Kojic acid	21.5±0.9	21.0±1.1	97.4±2.0
20% Kojic acid	21.5±1.4	21.5±1.2	99.9±0.8
AOO	21.5±1.8	21.3±1.3	99.5±2.3
20% HCA	21.9±1.7	20.6±2.0	93.9±2.6
30% HCA	21.5±0.5	21.4±0.2	99.5±2.3
40% HCA	22.5±1.0	20.9±1.8	93.0±4.2

^{a)}Day 5 means the day of necropsy. Data represents mean±S.D. of four animals. B.W. represents mean body weight. Percent change of B.W.=(Final body weight/Initial body weight)×100. AOO and DMF represent 4 : 1 acetone/olive oil and dimethylformide, respectively.

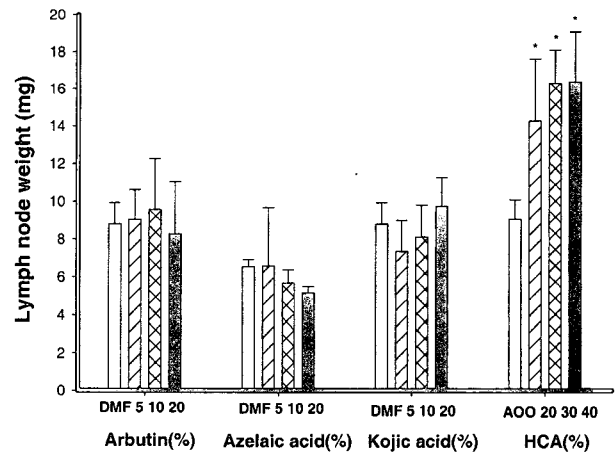


Fig. 1. The absolute weights of auricular lymph nodes in Balb/c mice treated with arbutin, azelaic acid, kojic acid, and HCA. Mice were treated with low, medium, and high concentrations in the appropriate vehicle. Each bar represents mean±SD of four animals. Asterisks indicate significant differences from the corresponding vehicle control ($p<0.05$).

되어 대조군에 비해 각각 1.6, 1.8, 1.8배가 증가하였다. 미백화장품 원료인 arbutin, azelaic acid, kojic acid를 투여하여 흉선과 비장의 중량변화를 측정 한 결과, 화장품 원료 도포에 따른 마우스에 흉선과 비장의 중량변화는 유

의성이 없었다. 그러나 약한 알러젠인 HCA 투여군 고용량군(30, 40%)에서 흉선 무게의 유의적인 감소가 관찰되었다(결과는 보이지 않았음).

귀에서의 증식능 변화

각 시험물질을 귀에 도포한 후 귀에서 나타나는 두께와

Table 2. The change of ear thickness in ear following treatment of mice with arbutin, azelaic acid, kojic acid and HCA

Treatment	Ear thickness (mm)	
	Left	Right
DMF	0.24±0.01	0.26±0.02
5% Arbutin	0.23±0.02	0.23±0.01
10% Arbutin	0.24±0.01	0.24±0.01
20% Arbutin	0.25±0.03	0.25±0.01
DMF	0.24±0.02	0.23±0.02
5% Azelaic acid	0.27±0.03	0.26±0.03
10% Azelaic acid	0.27±0.02	0.26±0.01
20% Azelaic acid	0.25±0.02	0.25±0.01
DMF	0.24±0.01	0.26±0.02
5% Kojic acid	0.24±0.01	0.25±0.01
10% Kojic acid	0.24±0.01	0.24±0.01
20% Kojic acid	0.24±0.03	0.24±0.02
AOO	0.18±0.05	0.20±0.03
20% HCA	0.22±0.03	0.26±0.02*
30% HCA	0.23±0.01	0.22±0.01
40% HCA	0.24±0.01	0.25±0.01*

Data represents mean±S.D. (n=4). AOO and DMF represent 4 : 1 acetone/olive oil and dimethylformide, respectively. *Significantly different from vehicle control (p<0.05).

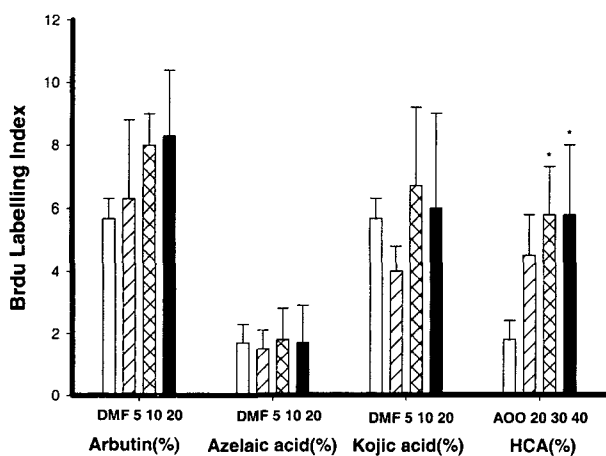


Fig. 2. Proliferative activity of ear after application of arbutin, azelaic acid, kojic acid, and HCA. Mice were treated with low, medium, and high concentrations in the appropriate vehicle. Each bar represents mean±SD of four animals. Asterisks indicate significant differences from the corresponding vehicle control (p<0.05).

증식능의 변화를 관찰하였다. 귀의 두께를 측정된 결과 미백화장품 원료인 약한 알러젠인 20%, 40% HCA군에서는 대조군에 비해 유의적인 증가를 관찰할 수 있었다. 그러나 arbutin, azelaic acid, kojic acid에서는 유의적인 변화를 관찰할 수 없었다(Table 2). 귀를 조직병리학적으로 관찰한 결과, arbutin, azelaic acid, kojic acid군에서는 투여에 의한 표피세포 두께의 증가나 염증반응을 관찰할 수 없었으나, 30%, 40% HCA군의 일부에서는 표피세포 두께의 증가가 관찰되었다.

귀의 증식반응을 측정하기 위하여 BrdU 면역염색을 실시한 결과, arbutin, azelaic acid, kojic acid군에서는 유의적인 변화를 관찰하지 못하였다. 그러나, 약한 알러젠인 HCA군에서는 대조군에 비해 유의적인 증가를 관찰할 수 있었다(Fig. 2).

림프절의 증식반응 평가

미백화장품 원료 arbutin, azelaic acid, kojic acid에 대한 이개 림프절의 반응을 현미경으로 관찰한 결과, 대조군에 비해 유의적인 변화는 관찰되지 않았다. 그러나 HCA 고용량군에서는 대조군에 비하여 이개 림프절의 크기가 커

Table 3. The change of cell proliferation in auricular lymph node following treatment of mice with arbutin, azelaic acid, kojic acid and HCA

Treatment	Cell proliferation			
	BrdU LI/ LN total	SI	BrdU LI/ LN(C+M)	SI
DMF	5.5±0.6		6.5±0.4	
5% Arbutin	6.0±1.7	1.2	6.4±1.8	1.0
10% Arbutin	6.7±1.9	1.3	7.3±1.8	1.1
20% Arbutin	7.4±1.2	1.4	7.9±0.8	1.2
DMF	2.3±0.3		2.8±0.5	
5% Azelaic acid	2.4±1.9	1.1	2.6±1.1	1.0
10% Azelaic acid	3.1±1.1	1.4	3.3±1.3	1.2
20% Azelaic acid	3.6±0.5	1.5	3.5±0.4	1.3
DMF	5.5±0.6		6.5±0.4	
5% Kojic acid	5.3±1.4	1.0	5.9±1.3	0.9
10% Kojic acid	5.8±1.7	1.1	6.3±1.9	1.0
20% Kojic acid	7.8±1.2	1.4	8.5±1.4	1.3
AOO	3.4±0.6		3.6±1.3	
20% HCA	9.2±0.2*	2.7	10.8±0.3*	3.0
30% HCA	9.4±2.6*	2.8	11.1±2.4*	3.1
40% HCA	12.9±2.0*	3.8	14.3±2.1*	3.9

Data represents mean±S.D. (n=4). SI=mean ratio of values found in the chemical-treated mice to that in vehicle-treated mice. LN and LN (C+M) represent the lymph node and lymph node (cortex+medulla), respectively. AOO and DMF represent 4 : 1 acetone/olive oil and dimethylformide, respectively. *Significantly different from vehicle control (p<0.05).

고찰

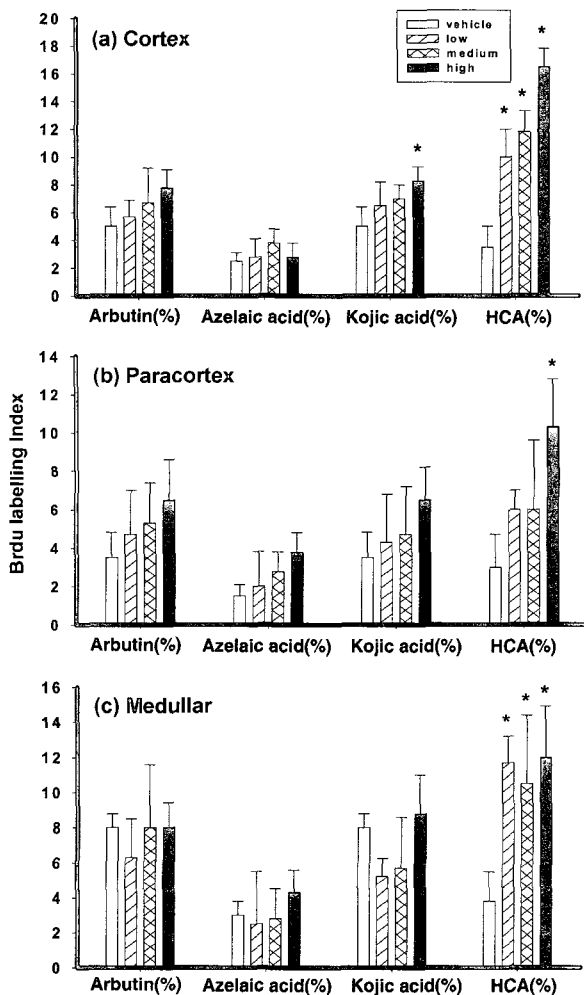


Fig. 3. Proliferative activity of local lymph nodes after application of arbutin, azelaic acid, kojic acid, and HCA. Balb/c mice were treated with low, medium, and high concentrations in the appropriate vehicle. Lymph nodes at both sites were removed 2 h after BrdU treatment and processed for BrdU staining to determine the percentage of BrdU-labelled cells in the cortex (a), paracortex (b), and medulla (c). Each bar represents mean \pm SD of four animals. Asterisks indicate significant differences from corresponding vehicle control ($p < 0.05$).

지고, 림프구의 증식이 관찰되었다. Arbutin, azelaic acid, kojic acid, HCA의 이개 림프절의 증식반응을 측정하기 위하여 BrdU 면역염색을 실시하여 피질, 방피질, 수질로 구분하여 관찰하였다. Arbutin의 경우 대조군에 비하여 BrdU LI(labelling index)의 증가가 관찰되지 않았다(Table 3). Kojic acid는 고용량군에서 피질의 증가가 관찰되었으나, 다른 부위의 증식은 관찰할 수 없었다. 그러나 HCA는 대조군에 비해 전용량군에서 피질, 방피질, 수질에서 BrdU LI가 유의성 있게 증가하였다(Fig. 3).

본 연구는 피부미백화장품 원료인 arbutin, azelaic acid, kojic acid 3종과 양성대조군으로서 미약한 알러젠인 α -hexylcinnamaldehyde (HCA)에 대하여 비방사선법을 이용한 LLNA시험방법으로 피부감작성 평가를 실시하였다. 피부미백화장품 원료 3종 모두 SI가 2 이하로 관찰되어 음성으로 나타났고, 약한 알러젠인 HCA는 3 이상으로 나타나 양성으로 판정되었다.

화학물질에 의한 피부감작성 대체시험법으로는 LLNA 방법과 MEST가 소개되고 있는데, OECD 독성시험 가이드라인에 상정되어 있는 시험방법은 LLNA시험이다(Gad 등, 1986; Kimber 등, 2001; Lee 등, 2003a). 이 LLNA 시험방법은 알러젠의 피부감작성을 이개 림프절의 증식반응을 이용하는 평가방법으로서 부검전 3H-thymidine을 미정맥에 투여하여 림프절에서 대조군에 비해 SI가 3 이상인 것을 알러젠으로 판정하는 시험법이다(Basketter 등, 1992; Loveless, 1996; Kimber 등, 1999; Lee 등, 2002a).

그러나 이 실험은 방사선 동위원소를 생체내에서 사용하기 때문에 방사선을 사용할 수 있는 제한적인 실험실에서만 이용될 수 있다. 따라서 좀 더 보편적인 방법으로 방사선 동위원소를 사용하지 않는 방법이 연구되고 있는데, BrdU를 이용하는 방법과 cytokine을 이용하는 방법, flow cytometry를 이용하여 림프절 세포의 표면항원을 측정하는 방법 등이 시도되고 있다(Boussiquet-Leroux 등, 1995; Arts 등, 1997; Dearman과 Kimber, 1999; Hariya 등, 1999; Manetz 등, 2001; Takeyoshi 등, 2001; Gerberick 등, 2002; Suda 등, 2002; Lee 등, 2002b, 2003b). BrdU는 thymidine analogue로서 세포의 증식을 측정하는 지표로 thymidine uptake의 대안으로 이용되고 있으며, 단클론 항체를 이용하여 면역조직화학 염색을 하여 BrdU Labelling index로 평가할 수 있다(Schutte 등, 1987; Lee 등, 2002b, 2003b). BrdU 면역조직화학기법으로 연구는 Boussiquet-Leroux 등(1995)이 처음 시도하였는데, CD1 마우스에서 LLNA 방법을 변형시켜 short protocol로 실험한 결과 potassium dichromate에 대하여 강한 양성을 보였으나, ethyl 3-amino-benzoate와 4-chloroaniline에 대하여는 증식반응을 관찰할 수 없었다. Arts 등(1997)은 Brown-Norway와 Wistar 랫드에서 TMA와 DNCB에 의해 림프절에서의 증식반응을 BrdU 면역조직화학염색으로 확인하였다. Lee 등(2002b)은 LLNA의 비방사선법으로서 이개 림프절에서의 알러젠의 증식정도를 BrdU 면역조직화학기법(immunohistochemistry)을 이용하여 평가하였는데, 방피질(paracortex) 보다는 피질(cortex)과 수질(medulla) 부위에서

DNCB와 TDI에 의한 labeling index(LI)가 증가하므로 BrdU를 이용한 면역조직화학기법이 유용한 지표로 이용할 수 있음을 제시하였다. 본 실험에서는 양성대조군으로 HCA를 선정하여 약한 알러젠에 대하여 비방사선 시험법을 이용한 평가를 시도하였는데, 20% 이상의 용량에서 양성 반응으로 관찰되는 결과를 얻었다. HCA 10% 용량에서는 림프절 증식이 거의 나타나지 않았다(결과는 보이지 않았음).

Nakagawa 등(1995)은 220명의 환자 중 kojic acid 함유 화장품을 바른 사람중 일부가 (5명) 접촉성 알러지 증상이 나타났다고 보고하였다. Serra-Baldrich 등(1998)은 30대의 여성이 kojic acid로부터 알러지성 접촉성 피부염이 발생되었다고 보고하였다. 그러나 본 실험에서는 kojic acid에 의한 림프절의 증식 반응은 고용량군의 피질에서만 관찰되었으나, 양성판정 기준에는 미치지 못하였고 전체적인 림프절의 과도한 증식은 관찰할 수 없었다.

피부미백화장품 원료를 BrdU 면역조직화학기법을 이용한 LLNA 시험으로 평가한 결과 arbutin, azelaic acid, kojic acid 모두 고용량인 20%에서도 림프절 증량의 증가 증식을 나타내지 않아 음성으로 관찰되었다.

참고문헌

- Arts, J.H.E., Droge, S.C.M., Spanhaak, S., Bloksma, N., Peninks, A.H. and Kuper, C.F. (1997): Local lymph node activation and IgE responses in Brown Norway and Wistar rats after dermal application of sensitizing and non-sensitizing chemicals. *Toxicology*, **117**, 229-237.
- Basketter, D.A. and Scholes, E.W. (1992): Comparison of the local lymph node assay with the guinea-pig maximization test for the detection of a range of contact allergens. *Fd. Chem. Toxicol.*, **30**, 65-69.
- Bossiquet-Leroux, C., Durand-Cabagna, G., Herlin, H. and Helder, D. (1995): Evaluation of lymphocyte proliferation by immunohistochemistry in the local lymph node assay. *J. Appl. Toxicol.*, **15**, 465-475.
- Botham, P.A., Basketter, D.A., Maurer, T., Mueller, D., Potokar, M. and Bontinck, W. (1991): Skin sensitization- a critical review of predictive test methods in animals and man. *Food Chem. Toxicol.*, **29**, 275-286.
- Buehler, E.V. (1965): Delayed contact hypersensitivity in guinea pig. *Arch. Dermatol.*, **91**, 171-177.
- Chakraborty, A.K., Funasaka, Y., Komoto, M. and Ichihashi M. (1998): Effect of arbutin on melanogenic proteins in human melanocytes. *Pigment Cell Res.*, **11**, 206-212.
- Curto, E.V., Kwong, C., Hermersdorfer, H., Glatt, H., Santis, C., Virador, V., Hearing, V.J. and Dooley, T.P. (1999): Inhibitors of mammalian melanocyte tyrosinase: *In vitro* comparisons of alkyl esters of gentisic acid with other putative inhibitors. *Biochem. Pharmacol.*, **57**, 663-672.
- Dearman, R.J. and Kimber I. (1999): Cytokine fingerprinting: Characterization of chemical allergens. *Methods*, **19**, 56-63.
- EC (European Communities) (1999): Council Directive 76/778/EEC in *CosmetLex Vol. 1. Cosmetics legislation*, pp. 1-68.
- Gad, S.C. and Weil, G.S. (1994): Statistics for toxicologists in *Principles and Methods of Toxicology* (Hayes, A.W ed.). Raven, New York, pp. 221-274.
- Gad, S.C., Dunn, B.J., Dobbs, D.W., Christopher, R. and Walsh, R.D. (1986): Development and validation of an alternative dermal sensitization test: The mouse ear swelling test (MEST). *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **84**, 93-114.
- Gerberick, G.F., Cruse, L.W. and Ryan, C.A. (1999): Local lymph node assay: Differentiating allergic and irritant responses using flow cytometry. *Methods*, **19**, 48-55.
- Gerberick, G.F., Cruse, L.W., Ryan, C.A., Hulette, B.C., Chaney, J.G., Skinner, R.A., Dearman, R.J. and Kimber, I. (2002): Use of a B cell marker (B220) to discriminate between allergens and irritants in the local lymph node assay. *Toxicol. Sci.*, **67**, 420-428.
- Haryia, T., Hatao, M. and Ichikawa, H. (1999): Development of a non-radioactive endpoint in a modified local lymph node assay. *Food Chem. Toxicol.*, **37**, 87-93.
- Hearing, V.J. and Tsukamoto, K. (1991): Enzymatic control of pigmentation in mammals. *FASEB J.*, **5**, 2902-2909.
- Iwata, M., Corn, T., Iwata, S., Everett, M.A. and Fuller, B.B. (1990): The relationship between tyrosinase activity and skin color in human foreskins. *J. Invest. Dermatol.*, **95**, 9-15.
- Kimber, I., Basketter, D.A., Bethold, K., Butler, M., Garrigue, J.L., Lea, L., Newsome, C., Roggeband, R., Steiling, W., Stropp, G., Waterman, S. and Wiemann, C. (2001): Skin sensitization testing in potency and risk assessment. *Toxicol. Sci.*, **59**, 198-208.
- Kimber, I., Dearman, R.J., Schole, E.W. and Basketter, D.A. (1994): The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicology*, **93**, 13-31.
- Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Edward, W.S. and Robert, V.H. (1995): An international evaluation of the murine local lymph node assay and comparison of modified procedures. *Toxicology*, **103**, 63-73.
- Kimber, I., Pichowski, J.S., Basketter, D.A. and Dearman, R.J. (1999): Immune responses to contact allergens novel approaches to hazard evaluation. *Toxicol. Lett.*, **106**, 237-246.
- Lee, J.K., Hwang, I.C., Park, J.H., Kim, H.S., Chung, S.T., Eom, J.H. and Oh, H.Y. (2002a): Evaluation of local lymph node assay as an alternative method for skin sensitization potential in Balb/c mice. *J. Toxicol. Pub. Health*, **18**, 175-181.
- Lee, J.K., Park, J.H., Kim, H.S., Chung, S.T., Eom, J.H., Nam, K.T. and Oh, H.Y. (2003a): Evaluation of cell proliferation in ear and lymph node using BrdU immunohistochemistry for mouse ear swelling test. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **14**, 61-68.
- Lee, J.K., Park, J.H., Park, S.H., Kim, H.S. and Oh, H.Y. (2002b): A nonradioisotopic endpoint for measurement of lymph node cell proliferation in a murine allergic contact dermatitis model, using bromodeoxyuridine immunohisto-

- chemistry. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **48**, 53-61.
- Lee, J.K., Park, J.H., Park, S.H., Kim, H.S., Chung, S.T., Eom, J.H., Yun, S.M., Jang, E.J., Choi, K.S. and Oh, H.Y. (2003b): A non-radioisotopic endpoint using Bromodeoxyuridine ELISA method for murine local lymph node assay. *J. Toxicol. Pub. Health*, **19**, 133-139.
- Loveless, S.E., Gregory, S.L., Gerberick, G.F. and Ryan, C.A. (1996): Further evaluation of the local lymph node assay in the final phase of an international collaborative trial. *Toxicology*, **108**, 141-151.
- Maeda, K. and Fukuda, M. (1991): In vitro effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **42**, 361-368.
- Maeda, K. and Fukuda, M. (1996): Arbutin: Mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **276**, 765-769.
- Magnusson, B. and Kligman, A.M. (1969): The identification of contact allergen by animal assay. The guinea pig maximization test *J. Invest. Dermatol.*, **52**, 268-276.
- Manetz, T.S., Pettit, D.A. and Meade, B.J. (2001): The determination of draining lymph node cell cytokine mRNA levels in BALB/c mice following dermal sodium lauryl sulfate, dinitrofluorobenzene and toluene diisocyanate exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **171**, 174-183.
- Nakagawa, M., Kawai, K. and Kawai K. (1995): Contact allergy to kojic acid in skin care products. *Contact Dermatitis*. **32**, 9-13.
- OECD (2002): Proposal for New test guidelines 429: Skin sensitization: Local lymph node assay. OECD, Paris (www.oecd.org/ehs).
- Pavel, S. (1993): Dynamics of melanogenesis intermediates. *J. Invest. Dermatol.*, **100**, 162S-165S.
- Serra-Baldrich, E., Tribo, M.J. and Camarasa, J.G. (1998): Allergic contact dermatitis from kojic acid. *Contact Dermatitis*, **39**, 86-87.
- Shutte, B., Rynders, M.M.J., Bosman, F.T. and Blijham, G.H. (1987): Effect of tissue fixation on anti-bromodeoxyuridine immunohistochemistry. *J. Histochem. Cytochem.*, **35**, 1343-1345.
- Sikorski, E.E., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Miller, C.M. and Ridder, G.M. (1996): Phenotypic analysis of lymphocyte subpopulations in lymph nodes draining the ear following exposure to contact allergens and irritants. *Fund. Appl. Toxicol.*, **34**, 25-35.
- Suda, A., Yamashita, M., Tabei, M., Taguchi, K., Vohr, H., Tsusui N., Suzuki, R., Kikuchi, K., Sakaguchi, K., Mochizuki, K. and Nakamura, N. (2002): Local lymph node assay with non-radioisotopic alternative endpoints. *J. Toxicol. Sci.*, **27**, 205-218.
- Takeyoshi, M., Yamaski, K., Yakabe, Y., Takatuski, M. and Kimber, I. (2001): Development of non-radio isotopic endpoint of murine local lymph node assay based on 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation. *Toxicol. Letters*, **119**, 203-208.