



대체 시험법을 활용한 줄기세포 화장품의 자극성 평가

오한슬^{1†}, 김시윤^{1†}, 한주희¹, 김진¹, 이은혜², 전혜련³, 석승혁³, 정초록⁴, 박재학^{1*}

¹서울대학교 수의과대학, 실험동물의학교실, ²대구한의대학교 의과대학
³서울대학교 의과대학, 미생물학교실, ⁴한국생명공학연구원

The Evaluation of the Potential Eye Irritation of Stem Cell Cosmetics using Alternative Methods

Hanseul Oh^{1†}, C-Yoon Kim^{1†}, Ju-Hee Han¹, Jin Kim¹, EunHye Lee², Hailian Quan³,
Seung Hyeok Seok³, Cho-Rok Jung⁴, Jae-Hak Park^{1*}

¹Department of Laboratory Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Seoul National University,
Seoul, Republic of Korea

²Department of Medical Science, Daegu Hanny University, Daegu, Republic of Korea

³Department of Microbiology & Immunology and Institute of Endemic Disease,
Seoul National University College of Medicine, Seoul, Republic of Korea

⁴Gene Therapy Research Unit, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon,
Republic of Korea

ABSTRACT. The global cosmetic market in 2014 was estimated to be worth to about 250 billion USD and has continued to grow. In particular, stem-cell based cosmetics, which can be used to repair skin and protect it from aging, have become recently trendy. However, the questionable safety issue of commercial stem-cell cosmetics has become a hot issue. Cosmetics consumers may buy a product without any information about the safety of products whose ingredients may have less than 10 years of commercial history. For the safety verification of cosmetics and ingredients, the classification for eye irritation needs to be conducted essentially. The Bovine Corneal Opacity & Permeability test (BCOP) is recommended as a validated alternative method for eye irritation by the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). Thus, in this study, we evaluated the eye irritation potential of commercial stem-cell based cosmetics by the BCOP assay, Hens Egg Test on the Chorio-Allantoic Membrane (HET-CAM) assay, and Human Umbilical Vein Endothelial cell (HUVEC) test. Our results showed that all 8 test substances were not classified as eye irritants which could cause serious eye damage according to the BCOP assay associated with histopathology and the HET-CAM assay. But four test substances showed to be mild irritants in the HUVEC test. To the best of our knowledge, our results are the first reported data about the classification of the potential eye irritation of stem-cell based cosmetics, and demonstrate that the validated BCOP assay combined with other alternative tests such as the HET-CAM assay and the HUVEC test, may be able to indicate mild to serious eye irritants.

KEY WORDS: BCOP assay, HET-CAM assay, HUVEC test, alternative methods, stem cell cosmetics

서론

Received: 11 August 2016
Revised: 22 September 2016
Accepted: 23 September 2016

* Corresponding author: Jae-Hak Park, DVM, PhD
Laboratory Animal Medicine, College of Veterinary Medicine
and Research Institute for Veterinary Science, Seoul National
University, Seoul 151-742, Republic of Korea
Tel: +82-2-887-1257
E-mail: pjhak@snu.ac.kr

2014년도 세계 화장품 시장 규모는 2500억 달러를 넘어섰으며, 국내 화장품 시장은 전통적인 화장품 강국인 미국, 일본, 독일, 프랑스에 이어 9위를 차지하고 있다 (박 등, 2015). 국내 화장품은 최근 그루밍족이라 불리는 남성 계층의 소비 증가와 한류열풍에 비례하여 중국에서 폭발적인 소비를 보이고 있다 (유와

김, 2009, 김과 오, 2013). 이는 국내 화장품 시장의 소비층의 저변을 확대하여, 글로벌 경제 위기에도 불구하고 국내 화장품 시장의 규모를 증가시키는 원동력이 되었다. 특히 줄기세포 유래 화장품은 피부상태의 개선, 노화방지, 미백에 탁월한 효능을 보여 2016년 현재 국내 화장품의 트렌드를 주도하고 있다 (Choi *et al.*, 2015). 2005년 처음으로 줄기세포 화장품 관련 특허 출원이 이루어진 이래로, 현재 특허·실용 신안 등록이 193건에 이르며, 동물 줄기세포뿐만 아니라 식물 줄기세포를 이용한 조성물 개발이 활발히 진행되고 있다 (특허청, 2016).

하지만 줄기세포 화장품은 안전성측면에서 아직 논란이 남아 있다. 2010년 식품의약품안전처에서는 줄기세포 배양액을 화장품 원료로 사용할 수 있도록 고시를 개정하였으며, 그 이후 다양한 줄기세포 화장품 벤처기업에서 줄기세포 배양액 또는 줄기세포 추출액을 화장품 원료로 개발하고 공급하고 있다 (김 등, 2013). 2016년 기준 무려 1300여개의 줄기세포 화장품이 소비층의 수요와 상업성에 비례하여 급속도로 증가하였음에도 불구하고, 원료의 개발과 상품화의 역사가 10여년에 불과하여 안전성이 완전히 확보되지 못한 상황에서 소비자에게 공급된다는 문제점이 제시되고 있다.

화장품 안전성 평가에서 인체의 눈에 대한 자극성 평가는 필수 항목으로, Organization for Economic Co-operation and Development (OECD)에서는 토끼를 이용한 안점막 자극 시험 (Draize rabbit eye irritation test)을 가이드라인 (TG 405)으로 제시하였다. 그러나 2009년 EU에서 동물시험을 통한 안전성 검증 화장품 원료에 대한 제품을 유럽 내 시판 금지를 시행하며, 실험동물의 불필요한 희생을 줄이고자 하는 노력이 이어져, 국내에서도 2015년 화장품 동물실험 금지 내용의 법안이 국회를 통과하였다 (이 등, 2014). 동물실험을 통한 안전성 평가가 어려워지는 상황임에도 불구하고, 줄기세포 화장품이 식품의약품안전처의 안전기준에 따라 제조되었는지에 대하여 시판 제품 안전성 검증의 필요성은 더욱 높아지고 있다. 이러한 흐름에서 실험동물을 활용하지 않는 대체 시험법이 객관적인 안전성 평가를 할 수 있는 최적의 수단이 될 수 있다.

이에 본 연구에서는 시판되고 있는 줄기세포 화장품에 대하여 국제적으로 인정받고 있는 대체시험법인 Bovine Corneal Opacity & Permeability test (BCOP)를 기반으로 안점막 자극을 평가하고, Hens Egg Test on the Chorio-Allantoic Membrane (HET-CAM)과

사람의 혈관내피 세포 배양주 (Human umbilical Vein Endothelial cell; HUVEC)을 활용하여 혈관 독성을 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시험 물질 선정

본 연구에서는 시중 판매 되고 있는 줄기 세포 성분 포함 화장품 8종을 무작위로 선정하였으며, 벤처 기업에서부터 대기업에 이르는 다양한 기업의 제품이 반영 되도록 선정하였다 (Table 1). HET-CAM test와 BCOP assay에서는 희석하지 않고 평가를 하였으며, HUVEC test에서는 시험물질을 0.1, 1, 10%로 PBS에 희석하여 평가하였다. BCOP assay와 HET-CAM test에서 음성 대조군은 0.9% 생리식염수를 사용 하였고, 양성대조군은 각각 100% N, N-dimethylformamide (DMF)와 Tween 20용액을 사용하였다. HUVEC test에서 음성대조군으로 PBS, 양성대조군으로 5% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) 용액을 사용하였다.

Table 1. The list of tested stem cell cosmetics

| Test substances | Source of stem cells | Properties |
|-----------------|----------------------|--------------------------|
| A | Plant nature | Transparent viscid fluid |
| B | Plant nature | Transparent viscid fluid |
| C | Plant nature | Opaque cream |
| D | Plant nature | Transparent viscid fluid |
| E | Plant nature | Transparent viscid fluid |
| F | Animal nature | Opaque cream |
| G | Animal nature | Transparent viscid fluid |
| H | Plant nature | Opaque cream |

2. BCOP assay

1) 소의 눈 준비

본 평가는 OECD guidelines for the testing of chemicals No. 437을 바탕으로 수행하였다 (OECD, 2013). 도축장에서 건강한 소의 도축 후 즉시 안구를 적출하여 100 IU/mL의 penicillin과 100 μ g/mL의 streptomycin을 첨가한 Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)에 완전히 담근 채로 얼음상자에 넣고 운반 하였다. 각막을 분리하기 전에 혼탁도, 상처 여부, 신생혈관생성 등을 검사하여, 이와 같은 결함이 없는 각막을 사용하였다. 각막을 상피와 내피 손상에

주의하며 2~3 mm의 공막 가장자리를 포함하여 가위로 잘라냈다. 공막을 포셉으로 잡고 홍채와 수정체를 분리하여 각막을 준비하였다.

2) 각막의 조건 설정

준비된 각막을 penicillin 과 streptomycin 불포함 HBSS 용액으로 가볍게 세척 후, 전방 챔버에는 각막의 상피가, 후방 챔버에는 각막의 내피가 위치하도록 각막 홀더에 장착하였다. 양쪽 챔버에 미리 데워진 (32 ± 1℃) phenol red를 불포함 MEM 배지를 채우고, 32 ± 1℃ water bath에서 1시간 동안 적응 시켰다. Opacitometer에 Calibration 용 홀더를 끼우고 측정 버튼을 누른 상태에서 opacity를 ‘0’으로 조정하고, 제공되는 표준 opaque sheet를 홀더에 끼워 opacity를 ‘75’로 조정하여 calibration을 진행하였다. 양쪽 챔버의 Eagle’s minimal essential medium (EMEM) 배지를 제거하고, 새로운 32℃ Minimum Essential Medium (MEM) 배지를 양쪽 챔버에 채워 Opacitometer를 이용하여 opacity 측정하였으며, 7이상을 나타낸 각막은 실험에서 제외하였다.

3) 시험물질의 적용 및 평가항목 측정

전방 챔버의 EMEM 배지를 주사기로 제거한 후, 홀더를 털어서 남아 있는 MEM 배지를 완전히 제거하였다. 전방 챔버의 자금쇠 링과 유리를 제거하고 각막을 덮을 수 있는 충분한 양의 크림을 scrapper로 골고루 발라 32℃에서 10분 노출 시켰다. 시험물질을 피펫으로 제거 한 후 phenol red 포함된 MEM 배지로 3번 세척 하여 시험물질이 모두 씻겨나가도록 하였다. 다시 전방 챔버의 자금쇠 링과 유리를 고정 하고, 전방 챔버에 새로운 MEM 배지를 채우고 2시간 동안 32℃에서 추가 배양하였다. Opacitometer 로 혼탁도를 측정 한 후, 양쪽 챔버의 MEM 배지를 제거하고, 후방 챔버에 새로운 MEM을 채우고 전방 챔버에는 32℃ fluorescein solution을 1ml 주입하였다. 32 ± 1℃ water bath에서 90 ± 5분 동안 배양하고, 후방 챔버의 MEM 배지를 모두 수거하여, 96 well plate의 한 sample 당 3개 well 에 360 μL씩 분주하였다. microtiter plate reader를 사용하여 파장 492 nm에서의 흡광도 (Optical Density, OD)를 측정하였다. 홀더를 분리하고 각막을 떼어내어 10% 중성 포르말린에 24시간 이상 고정하고, 다시 새로운 10% 중성 포르말린으로 바꾸어 주어 추가 고정을 한 후, 파라핀 블록 및 조직슬라이드를 제작하였다. Hematoxylin & Eosin (H&E) 염색을 하여, 광학현미경 하에서 조직의

손상 정도를 관찰하였다.

4) 안점막자극지수

(In Vitro Irritancy Score, IVIS) 산출

IVIS 산출식은 다음과 같다.

$$IVIS = \text{mean opacity value} + (15 \times \text{mean permeability OD490 value})$$

계산된 IVIS를 Table 2와 같이 Globally Harmonized System (GHS) 기준으로 하여 자극을 분류하였다.

Table 2. The IVIS cut-off values for BCOP assay

| IVIS | UN GHS |
|---------|---------------------------------|
| ≤ 3 | No category |
| >3; ≤55 | No prediction can be made |
| > 55 | Category 1 (serious eye damage) |

The United Nations Globally Harmonized System (UN GHS)

5) 조직 병리학적 평가

제작된 조직슬라이드 상에서 Table 3에 제시된 바와 같이 상피세포층, 기질세포층, 내피세포 층에 대하여 조직 병리학적 평가를 시행하였다. 상피세포 층에 대한 3가지 기준, 기질세포 층에 대한 3가지 기준과 내피세포 층에 대한 1가지 기준 즉, 총 7가지에 대한 평가 기준에 대하여 0-3점의 점수를 부여하고, 각 기준에 대하여 가중치를 두어 최종 점수를 산출하여 병리학적 자극 정도를 판정하였다. 최종 평가 점수를 바탕으로 1.8 이하의 점수는 mild, 1.8 초과 4이하의 점수를 moderate, 4초과의 점수를 severe로 조직병리학 적 평가를 시행하였다.

Table 3. The histopathological evaluation of cornea in BCOP assay

| Layer | Criteria | Ratio |
|-------------|--|-------|
| Epithelial | Erosion/attenuation, epithelium | 0.3 |
| | Degeneration, epithelium | 0.3 |
| | Denudation, epithelium | 0.5 |
| Stroma | Necrosis/loss, keratinocytes | 1 |
| | Edema, substantia propria | 1 |
| | Eosinophils infiltration, substantia propria | 1 |
| Endothelial | Necrosis/loss, endothelium | 1.5 |

3. HET-CAM test

1) 수정란 배양 및 CAM 준비

The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) Recommended Protocol: HET-CAM Test Method에 따라 실험을 수행하였다 (Stokes *et al.*, 2002). 2일령의 수정란 (덕이농장, 용인, 한국)을 자동배양기에 온도 $37.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 7\%$ 의 조건으로 9일간 배양하였다. 배양 10일차에 기실을 관찰하여 CAM이 잘 발달된 수정란만을 선택적으로 실험에 이용하였다. 난각을 제거 후, 난각막을 CAM에서 잘 분리할 수 있도록, 37°C 멸균 생리식염수를 처리하였다. 포셉을 이용하여 CAM 표면의 손상 없이 난각막을 제거하였다.

2) 시험물질의 적용 및 평가

한 시험 물질 당 3개의 수정란을 사용하였고, 준비된 CAM 표면에 시험 물질 $200 \mu\text{L}$ 를 도포하였다. 20초간 반응을 시킨 후, 37°C 멸균 생리식염수로 CAM을 세척하고 30초 후 혈관의 출혈, 용해, 응고 반응의 정도를 평가하였다. Table 4와 같이 종결 반응 평가법 (End Point Assessment)에 따라 각 항목 자극 평가 점수 합으로 S 값 (value)을 산출하였다

(조 등, 2008).

4. HUVEC test

1) 세포 배양 및 시험물질의 적용

HUVEC (GIBCO, Life Technologies)를 Medium 131 kit (GIBCO, Life Technologies) 배지에서 배양하였으며, 96 well plate에 5×10^4 cells/well로 파종하여 다시 24시간 배양을 하였다. 평가할 줄기세포 화장품을 세포에 24시간 처리한 후, methylthiazolydiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) 5mg/ml $25 \mu\text{L}$ 가하고 2시간 동안 배양하고, Dimethyl sulfoxide (DMSO)를 $100 \mu\text{L}$ 가하여 결정을 녹여 흡광도 570 nm에서 측정하였다.

결 과

1. BCOP를 이용한 자극성 평가

도축한 당일 소의 안구를 이용하여 시험을 진행하였으며, 음성대조군에서는 혼탁도가 평균 -1.667 이었으며 양성대조군에서는 혼탁도가 평균 93.333 이었다

Table 4. Classification of S score of HET-CAM assay (End point assessment)

| S score | Slightly irritating | Moderately irritating | Irritating | Severely irritating |
|--------------------|---------------------|-----------------------|------------|---------------------|
| < 6 | ○ | | | |
| $6 \leq S \leq 12$ | | ○ | | |
| $12 < S < 16$ | | | ○ | |
| $16 \leq$ | | | | ○ |

(Adapted from 조 등, 2008.)

Table 5. The results of opacity, permeability, IVIS and histopathological score of the test substances

| Test substances | Opacity (mean ± SE) | Permeability (mean ± SE) | IVIS (mean ± SE) | Histopathological score |
|------------------|---------------------|--------------------------|------------------|-------------------------|
| Negative control | -1.667 ± 0.333 | 0.064 ± 0.001 | -0.702 ± 0.343 | 0.3 |
| Positive control | 93.333 ± 9.871 | 1.783 ± 0.298 | 119.747 ± 12.581 | 5.2 |
| A | -0.333 ± 0.333 | 0.049 ± 0.003 | 0.397 ± 0.291 | 0.3 |
| B | -1.000 ± 0.577 | 0.062 ± 0.003 | -0.065 ± 0.531 | 0.3 |
| C | 2.333 ± 0.667 | 0.063 ± 0.005 | 3.281 ± 0.739 | 0.3 |
| D | -0.667 ± 1.202 | 0.065 ± 0.001 | 0.298 ± 1.208 | 0.3 |
| E | 0.333 ± 0.667 | 0.060 ± 0.003 | 1.281 ± 0.624 | 0 |
| F | 0.667 ± 0.667 | 0.079 ± 0.011 | 1.858 ± 0.671 | 0 |
| G | -1.333 ± 1.764 | 0.054 ± 0.002 | -0.523 ± 1.740 | 0.3 |
| H | -0.667 ± 1.202 | 0.079 ± 0.011 | 0.525 ± 1.042 | 0 |

SE: standard error.

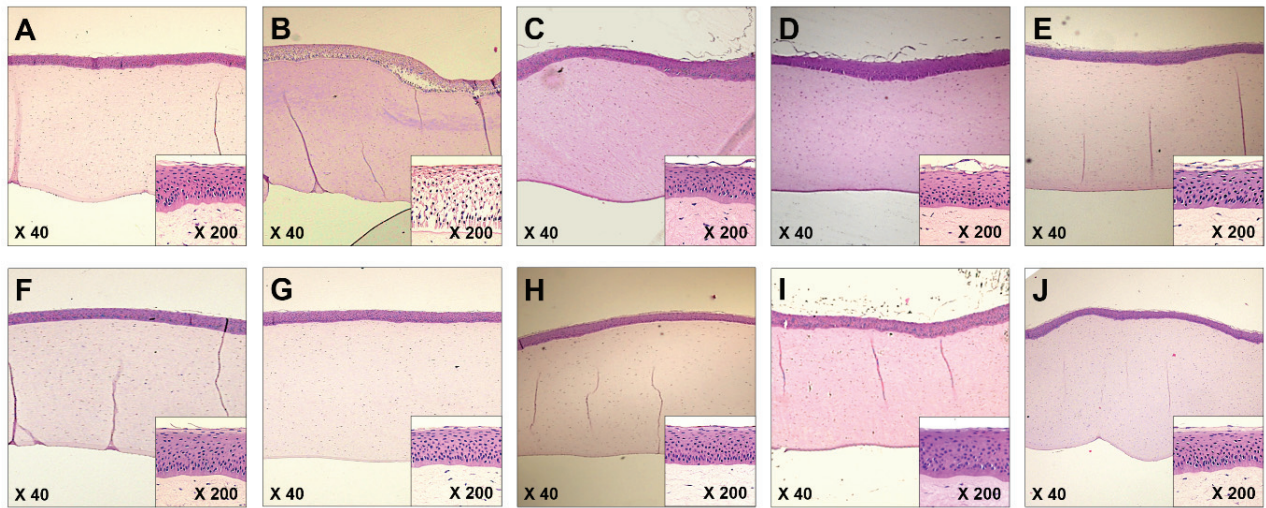


Figure 1. Histopathology of the bovine cornea treated with test substances. **A** Negative control, **B** Positive control, **C** Test substance A, **D** Test substance B, **E** Test substance C, **F** Test substance D, **G** Test substance E, **H** Test substance F, **I** Test substance G, **J** Test substance H.

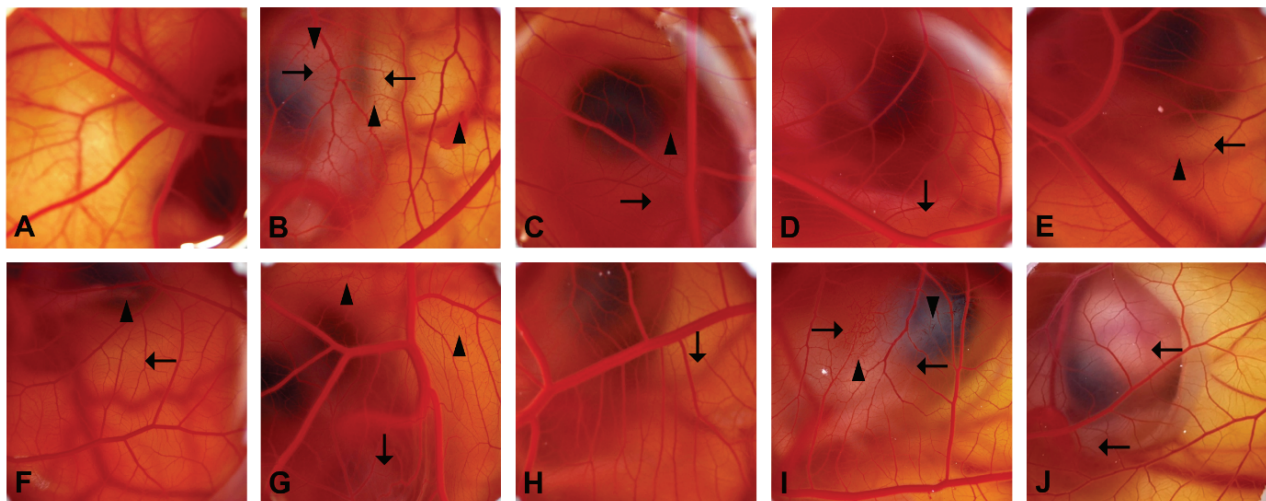


Figure 2. Representative results of the HET-CAM treated with test substances. **A** Negative control, **B** Positive control, **C** Test substance A, **D** Test substance B, **E** Test substance C, **F** Test substance D, **G** Test substance E, **H** Test substance F, **I** Test substance G, **J** Test substance H. Arrows indicate lysis and arrow heads indicate hemorrhage.

(Table 5). 음성대조군은 UN GHS 기준으로 IVIS가 3 이하로서 no category로 판정되었고, 양성대조군은 IVIS 119.75로 Category 1 심한 안자극 물질로 판정되었다. 각각의 조직 병리 판정 결과는 음성 양성대조군 물질이 0.3 과 5.7로써 위의 IVIS 판정기준과 일치하였다. 본 연구에서 시험한 물질 8가지 중 7가지가 IVIS 3 이하 no category이었고, 조직 병리 결과 소견도 mild로 판정되었다. 다만, C 시험물질의 IVIS는 3.281로 No prediction can be made로 판정되었지만, 조직 병리 결과 0.3으로서 mild로 판정되었다 (Fig. 1). 따라서 시험한 8종의 줄기세포 유래 화장품

은 모두 BCOP 시험법에 근거하여 no category로 판정되었다.

2. HET-CAM을 이용한 혈관 자극성 평가

본 연구에서 음성대조군은 non irritating으로 판정되었고, 양성대조군은 S value가 17로 severely irritating으로 판정되었다 (Table 6). 시판되는 줄기세포 화장품 8종을 대상으로 HET-CAM test를 시행한 결과, 3가지의 시험물질 D, E, G에 대하여 약한 또는 중등도의 용해와 출혈이 보여 moderate

irritating으로 판정되었고 (Fig. 2), 나머지 5가지 시험물질은 s value 6 미만의 slightly irritating으로 판정이 되었다.

Table 6. The results of hemorrhage, lysis, and coagulation score of the HET-CAM treated with test substances

| Test substances | S value | Rate |
|------------------|---------|---------------------|
| Negative control | 0 | Non irritating |
| Positive control | 17 | Severely irritating |
| A | 5 | Slightly irritating |
| B | 3 | Slightly irritating |
| C | 5 | Slightly irritating |
| D | 7 | moderate irritating |
| E | 8 | moderate irritating |
| F | 3 | Slightly irritating |
| G | 9 | moderate irritating |
| H | 5 | Slightly irritating |

3. HUVEC을 이용한 혈관내피세포 독성 평가

8가지 시험 물질에 대하여 혈관내피세포의 독성을 측정 한 결과, 음성대조군의 흡광도를 100%로 normalization 하였을 때, 10% 희석한 6가지 시험물질의 세포 생존율이 유의적으로 감소하였고, 특히 D, E, G 시험물질에서 50% 이하의 세포 생존율을 보여 상대적으로 강한 독성을 보였다. 1%로 희석하여도 여전히 4가지 시험물질 C, D, E, H 에서 유의적인 세포 생존을 감소를 보였고, A, B, F, G 에서는 유의적 감소가 없었다 (Fig. 3).

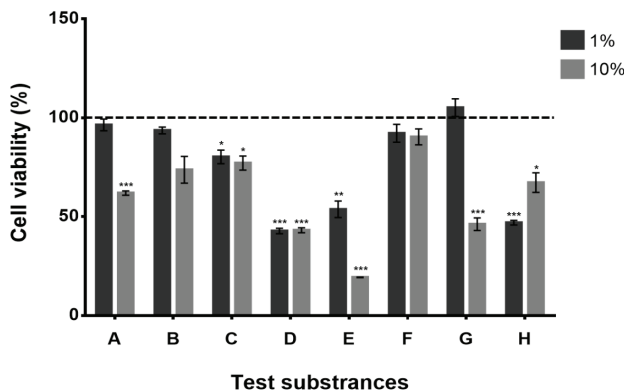


Figure 3. The effects of test substances on HUVECs viability. HUVECs were incubated with various concentrations of test substances (1, 10%) for 24 hours. The cell viability was determined using MTT assay. Data were normalized as a percentage of control. Data were the mean± SE (n=4). *** p<0.0001, ** p<0.001, * p<0.01.

고 찰

실험동물을 이용한 화장품 원료의 안전성 평가를 규제하는 세계적인 흐름에 따라, 자극성에 평가에 대한 여러 대체법이 제시되고 있다. ICCVAM과 the European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing (EURL-ECVAM)에서는 대표적으로 BCOP와 the Isolated Chicken Eye test (ICE)를 미국과 EU에서 안점막 자극 평가의 대체시험법으로 인준하고 있다. 이에, 본 연구에서는 최근 기능성 화장품으로 두각 되고 있는 줄기세포 유래 화장품에 대한 안전성을 대체시험법을 통해 확인하고자, 먼저 BCOP 자극성 평가를 시행하였다. 하지만, BCOP 평가는 부식성(ocular corrosives) 또는 심각한 자극성(ocular severe irritants) 물질을 확인하고 각막 상피조직에 대한 자극을 검증할 수 있지만, 약한 자극성(moderate and mild irritants)을 확인하기 어렵고 안점막 내의 혈관에 대한 자극 평가에서 한계를 나타낸다. 따라서 안점막에서의 혈관 손상과 같이 약한 자극에 대한 독성을 통합적으로 판단하기 위해, HET-CAM을 이용한 자극성 평가를 시행하였다 (Rouquier *et al.*, 1992, Sun *et al.*, 2015). 더불어 *in vitro* 수준에서 혈관 내피에 대한 줄기세포 유래 화장품의 미세 독성을 비교·검증하기 위하여, HUVECS을 활용한 독성 평가를 수행하였다 (Nilforoushzadeh *et al.*, 2014, Sun *et al.*, 2015).

Table 5에서 보여주는 바와 같이, BCOP 평가에서 C 시험물질을 제외한 7가지의 줄기세포 유래 화장품들이 IVIS가 3 이하로서 no category로 판정되었고, 조직 병리학적 결과에서도 1.8 이하의 score를 나타내어 종합적으로 심한 자극성이 없는 것으로 판정되었다. 다만 C 시험 물질은 IVIS에서 No prediction can be made로 판정되었으나, 조직 병리학적 결과에서 기질의 변화는 없고, 상피세포가 완만하게 소실되는 변화를 보여, 종합적으로 BCOP 평가에서 각막 상피 및 조직에는 심한 자극성은 없는 것으로 사료되었다.

반면, 안점막 내 혈관에 대한 줄기세포 화장품의 자극성을 확인하기 위해 시행한 HET-CAM 평가에서는, 3가지 줄기세포 유래 화장품들이 혈관의 lysis와 hemorrhage를 유발하여, moderate irritating 수준의 혈관 자극성이 확인되었다 (Table 6.). 이 결과를 세포수준에서 검증하기 위해, 농도 별로 희석된 시험물질에 대해 HUVEC test를 시행하였고 그 결과, HET-CAM 평가에서의 혈관 자극성 결과와 유사한 경향으로 D, E, G 시험물질은 HUVEC test에서도 세

포 생존율이 50% 이하로 나타나는 상대적으로 강한 독성이 나타났다. 이는 줄기세포 유래 화장품을 사용할 때, 혈관 내피세포에 자극적 손상을 야기하여 충혈, 용해와 같은 혈관 독성을 야기할 수 있음을 의미한다. 뿐만 아니라, 4 가지의 시험물질이 1%로 희석하여 평가한 결과에서도 세포 생존율이 유의적으로 감소하였다는 결과를 바탕으로, 매일 사용하는 화장품의 특성을 고려하여 약한 자극성의 반복적인 노출에 대한 평가가 필요함을 시사한다. 더불어, HET-CAM 에서 slightly irritating 으로 판정된 3 개의 시험물질 A, C, H 가 민감하게 HUVEC test 에서 독성 반응을 보이는 것으로 미루어 볼 때, 안점막 자극평가에서의 혈관 독성을 보다 민감한 수준에서 평가하기 위한 방법으로 HUVEC 의 활용 가능성을 보여주었다. 따라서 심각한 자극성이거나 부식성의 유무를 밝히는데 유용한 BCOP 평가를 HUVEC 평가와 함께 진행된다면 안점막 독성 평가에 있어 상승효과를 낼 것으로 사료된다.

본 연구를 통하여 시판되고 있는 8 가지 줄기세포 유래 화장품이 심한 자극성을 보이지는 않지만, 약한 자극성을 나타낼 수 있음을 확인하였다. 더불어 본 연구 결과는 시판되는 줄기세포 화장품의 안전성을 처음으로 검증하였고, 기반 데이터를 확보하였다는 의의가 있다. 물론, HUVEC 을 이용한 자극성 평가를 사람의 독성 평가에 적용하기 위해서는 향후 추가적인 validation 및 standardization 과정이 필요하다. 하지만 in vitro 혈관독성 대체법으로의 시도는 민감한 독성 평가를 위한 평가 방법으로서 동물실험 대체를 위한 연구 기반을 제공할 수 있으며, 향후 시판되고 있는 화장품의 사후 안전성 검증의 수단으로 활용 될 수 있을 것이라 사료된다.

감사의 글

이 연구는 2015 년도 KRIBB 기관고유사업의 연구비 지원에 의해 수행 되었습니다. 더불어 BK21 플러스 수의창의연구인력양성사업단과 서울대학교 수의과학연구소의 지원에 의하여 수행되었습니다.

참고 문헌

- 김경진와 오대원. (2013). 한류 문화가 중국 소비자의 한국 저가화장품 인식에 미치는 영향. *문화산업연구* **13**: 1-10.
- 박종숙, 고민영, 황순옥, 장준은, 서건석. (2015). 2015 년 화장품산업 분석 보고서. 보건산업진흥원.
- 김정선, 박은자, 윤시몬, 이서희, 배문주. (2013). 화장품 및 의약품에 대한 소비자 중심적 연구.
- 유승희와 김주덕. (2009). 연구논문: 남성들의 생활 습관 및 화장품 구매행태에 관한 연구. *한국미용학회지* **15**: 1019-1032.
- 이내경, 박현지, 임경민. (2014). 연구논문: 인공 피부, 인공 각막 모델을 활용한 동물실험 대체법 연구의 최근 동향. *동물실험대체법학회지* **8**: 29-36.
- 조선아, 안수선, 김한근, 이태룡. (2008). HET-CAM 법을 이용한 화장품 원료와 제품의 안자극 가능성 평가. *동물실험대체법학회지* **2**: 5-9.
- Choi SH, Yun J & Kwon SM. (2015). Study of functional cosmetics based on stem cell technology. *Tissue Eng Regen Med* **12**: 78-83.
- Nilforoushzadeh MA, Javanmard SH, Ghanadian M, Asghari G, Jaffary F, Yakhdani AF, Dana N & Fatemi SA. (2014). The Effects of Adiantum capillus-veneris on Wound Healing: An Experimental In Vitro Evaluation. *Int J Prev Med* **5**: 1261-1268.
- OECD (2013) Test No. 437: Bovine corneal opacity and permeability test method for identifying i) chemicals inducing serious eye damage and ii) chemicals not requiring classification for eye irritation or serious eye damage. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4.
- Rougier A, Cottin M, de Silva O, Roguet R, Catroux P, Toufic A & Dossou KG (1992) In vitro methods: their relevance and complementarity in ocular safety assessment. *Lens Eye Toxic Res* **9**: 229-245.
- Stokes WS, Schechtman LM & Hill RN. (2002). The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM): a review of the ICCVAM test method evaluation process and current international collaborations with the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM). *Alternatives to laboratory animals: ATLA* **30**: 23-32.
- Sun Q, Heilmann J & Konig B. (2015). Natural phenolic metabolites with anti-angiogenic properties - a review from the chemical point of view. *Beilstein J Org Chem* **11**: 249-264.
- 특허청. (2016). <http://link.kipris.or.kr/link/AJAX/CTOTAL.jsp>. 검색어: 줄기세포 유래 화장품 조성물.