

등록번호

안내서-0748-01

# 화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인 (I) (민원인 안내서)

- *In vitro* 3T3 NRU 광독성시험법
- 피부감작성시험 : 국소림프절시험법(LLNA)

2007. 11.



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

독성평가연구부 특수독성과

# 지침서·안내서 제·개정 점검표

명칭

화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인(Ⅱ) (민원인 안내서)

아래에 해당하는 사항에 체크하여 주시기 바랍니다.

<b>등록대상 여부</b>	<input type="checkbox"/> 이미 등록된 지침서·안내서 중 동일·유사한 내용의 지침서·안내서가 있습니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	☞ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 기존의 지침서·안내서의 개정을 우선적으로 고려하시기 바랍니다. 그럼에도 불구하고 동 지침서·안내서의 제정이 필요한 경우 그 사유를 아래에 기재해 주시기 바랍니다. (사유 : _____ )	
	<input type="checkbox"/> 법령(법·시행령·시행규칙) 또는 행정규칙(고시·훈령·예규)의 내용을 단순 편집 또는 나열한 것입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 단순한 사실을 대외적으로 알리는 공고의 내용입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 1년 이내 한시적 적용 또는 일회성 지시·명령에 해당하는 내용입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 외국 규정을 번역하거나 설명하는 내용입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 신규 직원 교육을 위해 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 정리한 자료입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
☞ 상기 사항 중 어느 하나라도 '예'에 해당되는 경우에 지침서·안내서 등록 대상이 아닙니다. 지침서·안내서 제·개정 절차를 적용하실 필요는 없습니다.		
<b>지침서·안내서 구분</b>	<input type="checkbox"/> 내부적으로 행정사무의 통일을 기하기 위하여 반복적으로 행정사무의 세부기준이나 절차를 제시하는 것입니까? (공무원용)	<input type="checkbox"/> 예(☞ <b>지침서</b> ) <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 대내외적으로 법령 또는 고시·훈령·예규 등을 알기 쉽게 풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전처의 입장을 기술하는 것입니까? (민원인용)	<input checked="" type="checkbox"/> 예(☞ <b>안내서</b> ) <input type="checkbox"/> 아니오
<b>기타 확인 사항</b>	<input type="checkbox"/> 상위 법령을 일탈하여 새로운 규제를 신설·강화하거나 민원인을 구속하는 내용이 있습니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	☞ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 상위법령 일탈 내용을 삭제하시고 지침서·안내서 제·개정 절차를 진행하시기 바랍니다.	
<b>상기 사항에 대하여 확인하였음.</b>		
<b>2017년      5월      31일</b>		
<b>담당자 확 인(부서장)</b>		<b>고 경 육 이 종 권</b>

이 안내서는 화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인(I)에 대하여 알기 쉽게 설명하거나 식품의약품안전처의 입장을 기술한 것입니다.

본 안내서는 대외적으로 법적 효력을 가지는 것이 아니므로 본문의 기술방식 ('~하여야 한다' 등)에도 불구하고 민원인 여러분께서 반드시 준수하셔야 하는 사항이 아님을 알려드립니다. 또한, 본 안내서는 2007년 11월 현재의 과학적·기술적 사실 및 유효한 법규를 토대로 작성되었으므로 이후 최신 개정 법규 내용 및 구체적인 사실관계 등에 따라 달리 적용될 수 있음을 알려드립니다.

※ "민원인 안내서"란 대내외적으로 법령 또는 고시·훈령·예규 등을 알기 쉽게 풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전처의 입장을 기술하는 것 (식품의약품안전처 지침서등의 관리에 관한 규정 제2조)

※ 본 안내서에 대한 의견이나 문의사항이 있을 경우 식품의약품안전평가원 독성평가연구부 특수독성과에 문의하시기 바랍니다.

전화번호: 043-719-5152

팩스번호: 043-719-5150

## 제·개정 이력

연번	제·개정번호	승인일자	주요내용
1	B1-2007-4-002	2007.11.	화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인(I) 제정
2	안내서-0748-01	-	「식약처 지침서등의 관리에 관한 규정」 개정에 따른 일괄 재분류 (규제개혁담당관실-3761호,2017.5.16)

# 발 간 사

화장품은 사람들에게 아름다움과 풍요로움을 주는 제품으로서 일상 생활에서 필수적인 제품으로 자리 잡고 있으며, 화장품의 종류와 사용법이 날로 새로워지고 있습니다. 또한 세계적인 웰빙 열풍에 따라 기능성화장품, 천연유래 화장품의 개발이 급증하고 있으며, 이와 더불어 새로운 화장품원료의 개발도 증가하고 있는 추세입니다.

화장품은 매일 수차례, 평생을 통하여 사용하는 제품이므로 안전성에 대한 확보는 아무리 강조해도 지나치지 않을 것입니다. 화장품의 안전성을 확보하기 위한 일환으로 우리청에서는 단회투여독성시험, 1차피부자극시험법 등의 독성시험방법을 고시하고 있습니다.

인류의 건강을 위하여 수행되고 있는 독성시험방법들은 다수의 실험동물을 희생시키고 있으므로, 동물보호 운동과 더불어 실험동물의 희생을 최소화 하도록 노력하는 것이 세계적인 추세로 자리 잡고 있습니다. 이에 따라 실험동물을 사용하지 않거나(replacement), 동물의 수를 줄이거나(reduction), 고통을 완화하는(refinement) 방법으로 대체시험법들이 개발되고 있습니다.

이러한 추세에 발맞추기 위하여 우리청에서도 광독성시험과 피부감작성시험에 대한 대체시험방법 가이드라인을 제정하게 되었으며, 앞으로도 지속적으로 동물대체시험법 연구와 가이드라인 제정에 힘 쓸 것입니다. 우리청은 이 가이드라인이 실험동물 보호라는 기본적인 목적과 더불어 국내 화장품 관련 업계 및 학계에 화장품의 안전성 연구 활성화에 기여할 것으로 기대하고 있습니다. 화장품 안전성 확보와 실험동물의 보호라는 두 마리 토끼를 잡기 위한 이러한 노력이 결실을 맺기 위해서는 정부뿐만이 아니라 관련 산·학·연에서도 동시에 노력을 기울여야 할 것입니다.

마지막으로 동물대체시험법 연구와 이 가이드라인 제정을 위하여 힘써주신 식약청 화장품평가팀과, 국립독성과학원 면역독성팀 직원들의 노고를 치하하며 아무쪼록 이 가이드라인이 화장품의 안전성 확보에 기여하길 기대합니다.

2007년 11월

식품의약품안전청장 김 명 현

# I. 서론

## 1. 배경

- 가. 화장품 안전성 평가에 있어 국제적으로 동물대체시험법의 요구가 높아지고 있으며, 유럽에서는 화장품 안전성 평가 시 실험동물 이용을 금지시키는 법안이 통과됨
- 나. 화장품산업이 급속하게 과학화, 국제화가 추진되고 있어 화장품에 대한 과학적이고 효율적인 안전성 평가방법의 가이드라인이 요구됨
- 다. 이에 따라 화장품의 안전성 평가 시 국제적으로 대두되고 있는 동물대체시험법을 고려하여 동물대체시험법에 대한 가이드라인을 제정하고자 함

## 2. 목적

- 가. 국제적 추세에 맞는 과학적이고 객관적인 동물대체시험법을 제시함으로써 화장품 안전성 평가에 기여하고,
- 나. 표준화된 동물대체시험법 가이드라인의 제시로 화장품업계 및 독성시험 연구기관의 국제 경쟁력을 향상시키고자 함

## II. *In vitro* 3T3 NRU 광독성시험 (*In vitro* 3T3 NRU phototoxicity test)

### 1. 개요

- 가. 광독성은 화학물질을 인체의 전신 또는 국소에 적용한 후 빛에 노출되어 유도되거나 증가되는 독성반응을 말한다.
- 나. *In vitro* 3T3 NRU(Neutral Red Uptake) 광독성시험은 빛에 노출 후 여기된 화학물질에 의해 유도되는 잠재적 광독성을 평가하는 것이다. 본 시험법은 빛의 유무에 따라 화학물질에 노출된 세포의 생존율 변화를 측정함으로써 광 세포독성을 평가하는 것이다. 본 시험법에 의해 확인된 물질들은 *in vivo*에서 전신투여를 통해 피부에 분포되거나 국소적용 되었을 때 광독성을 일으킬 가능성이 있다 (정의: 별첨 1).

### 2. 사전 고려사항

- 가. 많은 화학물질이 광독성을 유발하는 것으로 보고되고 있다. 이들의 일반적인 특징은 태양광 내의 빛에너지를 흡수한다는 것이다. 광화학 제 1 법칙(Grotthaus-Draper 법칙)에 따르면, 광반응이 일어나기 위해서는 충분한 빛에너지를 흡수해야 한다. 따라서 광독성시험을 실시하기 전에 화학물질의 자외/가시부 흡수스펙트럼(UV/Vis absorption spectrum)을 결정한다. 만약 화학물질의 몰 흡광계수(molar extinction/absorption coefficient)가  $10 \ell \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  이하면 그 화학물질은 광반응을 일으킬 가능성이 없어 독성평가를 위한 *in vitro* 3T3 NRU 광독성시험이나 다른 생물학적시험을 할 필요가 없다 (별첨 2).
- 나. *In vitro* 3T3 NRU 광독성시험은 *in vivo* 급성 광독성시험 결과를 예측할 수 있음이 밝혀졌다. 그러나 본 시험법은 화학물질과 빛의 복합작용으로 나타날 수 있는 광유전독성, 광알레르기, 광발암성과 같은 부작용 예측이나 광독성의 정도를 평가하도록 디자인된 시험법은 아니

다. 또한 본 시험법은 광독성의 간접적 기전, 시험물질 대사산물 및 혼합물의 영향 등을 보기 위하여 디자인된 시험법은 아니다.

다. 유전독성과 발암성을 예측하기 위한 모든 *in vitro* 시험에서는 대사 활성계를 이용하는 것이 일반적이다. 하지만 아직까지 광독성의 경우에는 화학물질이 *in vitro* 또는 *in vivo*에서 대사적 변환이 일어나 광독성 물질로 작용하는 예는 매우 드물어 본 시험을 수행할 때에는 과학적으로 대사 활성계의 필요성이 고려되지 않는다.

### 3. 시험법의 원리

가. 본 시험법의 기본 원리는 세포독성을 나타내지 않는 수준의 빛에 노출되었을 때와 노출되지 않았을 때의 화학물질에 의한 세포독성을 비교하는 것이다. 세포독성은 화학물질 처리 24시간 후 염색시약인 neutral red 흡수의 감소 정도를 측정하여 평가한다. Neutral red는 비확산에 의해 세포막을 통과하여 라이소좀 안에 축적되는 양이온성 염색시약이다. 민감한 라이소좀 막의 변화로 라이소좀이 약하게 되고 비가역적인 다른 변화들이 유도된다. 생체이물질 활성화에 의해 유도된 변화는 결과적으로 neutral red의 흡수와 결합을 감소시켜 살아있는 세포와 손상된 세포(죽은 세포)를 구별할 수 있게 한다.

나. Balb/c 3T3 세포를 96 well 플레이트(plate) 2개에 단층배양(monolayer) 하고, 시험물질을 8가지 농도로 1시간 동안 전처리 한다. 2개의 플레이트 중 1개는 세포독성을 일으키지 않는 최대 용량의 자외선을 조사하고, 다른 플레이트는 어두운 곳에 둔다. 새로운 배지로 교환하고 24시간 동안 배양한 후 neutral red 흡수 정도로 세포 생존율을 검사한다. 세포 생존율은 각각의 농도별로 무처리 용매대조군에 대한 백분율(%)로 계산한다. 자외선 조사를 한 것과 하지 않은 것에서 얻어진 IC<sub>50</sub> 값(음성대조군과 비교하여 세포 생존율이 50%로 감소되는 농도)을 비교하여 광독성의 가능성을 예측한다.



## 4. 시험방법

### 가. 사전 준비

#### 1) 세포

마우스 섬유아세포(fibroblast) 세포주인 Balb/c 3T3 clone 31(ATCC 또는 ECACC)이 타당성 검증연구에 사용되었으므로 이 세포주의 사용을 권장한다. 다른 세포나 세포주를 사용할 수 있으나 본 시험에 사용하는 세포주와의 동등성을 반드시 입증하여야 한다. 세포의 마이코플라스마(mycoplasma) 오염 및 세포의 UV 민감도를 정기적으로 검사한다. 세포의 UVA에 대한 민감도는 계대수(passage number)와 관련되어 있으므로, 100이하의 낮은 계대수의 세포를 사용하여야 한다.

#### 2) 배지와 배양조건

Balb/c 3T3 세포의 경우 10% NBCS(new-born calf serum), 4 mM 글루타민, 페니실린(100 IU) 및 스트렙토마이신(100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 등이 포함된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)을 배지로 사용하며 37°C, 완충액에 따라 5-7.5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양한다. 이 세포에 대해 이미 알려진 분열주기 범위 내에 있는지를 확인하여야 한다.

#### 3) 배양 준비

냉동 보관된 세포는 적절한 밀도로 배지에 분주하여 광독성시험을 하기 전에 적어도 한 번 계대배양을 한다. 광독성시험을 위해 사용할 세포는 적절한 밀도로 배지에 분주하여 시험 종료 시(세포배양 48 시간 후 세포 생존율을 결정하는 시기)에도 세포가 플레이트 바닥 전체를 덮지 않도록 한다. 96 well 플레이트에서 배양하는 Balb/c 3T3 세포에 대해 권고하는 배양 밀도는  $1 \times 10^4$  cells/well 이다. 시험 물질 1개당 각각 2개의 96 well 플레이트에 동일한 조건으로 세포를 배양한다. 1개의 플레이트에는 UV를 조사하고(+Irr) 다른 1개는 UV를 조사하지 않으며(-Irr), 나머지 조작과정은 동시에 동일하게 진행한다.

#### 4) 시험물질 준비

보관조건에서 그 안정성을 입증할 수 있는 자료가 없다면 시험물질은

사용 직전에 준비한다. 시험물질 취급과 처리는 시험물질이 광활성화 되거나 분해되지 않는 조명 하에서 수행하도록 한다. UV 조사 중 간섭을 피하기 위해 단백질 성분이나 광 흡수 성분(예: pH-지시약, 비타민) 등이 없는 완충액[예: EBSS(Earle's Balanced Salt Solution)]에 시험물질을 녹인다. CO<sub>2</sub> 배양기 밖에서 50분간 세포에 UV를 조사하는 중에 알칼리화 되지 않도록 주의를 기울여야 한다. EBSS와 같은 약한 완충액을 사용할 경우 7.5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하고, 강한 완충액을 사용하는 경우 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양한다. 물에 잘 녹지 않는 시험물질은 적절한 용매에 녹인다. 용매는 모든 농도의 시험군과 용매대조군에서 같은 용량이어야 하고, 그 농도에서 세포독성이 없어야 한다. 또한 시험물질의 농도는 침전물이 생기거나 혼탁해지지 않는 범위로 선택한다. 용매로는 DMSO(dimethylsulphoxide)와 에탄올(EtOH)이 권장된다. 이외에 세포독성이 약한 다른 용매도 사용할 수 있다. 모든 용매에 대해서 시험물질과의 반응성, 광독성 효과의 방해, 라디칼 제거 특성, 용매 속에서의 화학적 안정성에 대한 특성이 검토되어야 한다. 또한 시험물질의 안정성에 영향을 주지 않는다면 용해에 도움이 되는 와류혼합(vortex mixing), 초음파 처리, 가온 등을 이용할 수 있다.

##### 5) UV 조사조건

- **광원:** 광독성시험에서 적절한 광원과 필터의 선택은 중요한 요소이다. 보통 *in vivo*에서는 UVA와 가시광선이 광독성 반응과 관련이 있으며 UVB는 광독성 반응과는 관련이 적지만 세포독성이 매우 강하다. 파장이 313 nm에서 280 nm로 바뀌면 세포독성은 1000배 증가한다. 적절한 광원에 대한 선택 기준은 시험물질이 흡수하는 파장대(흡수스펙트럼)의 빛을 방출해야 하며, 잘 알려진 광독성 물질들을 검출하기에 충분한 광량(합리적인 시간 내에 도달할 수 있는)이어야 한다. 또한 사용되는 파장과 광량이 시험계에 부당한 영향(예: 적외선 영역에서의 열 방출)을 주어서는 안 된다. 인공태양광조사기(solar simulator)를 사용하는 것이 적절한 인공광원으로 생각되고 있다. 필터를 장착한 인공태양광조사기의 광도 분포는 한낮의 야외 광도 분포와 유사하여야 한다. 제논 아크(xenon arc)와 수은-할로겐 아크(mercury-metal halide arc)는 둘 다 인공태양광 조사장치로 사용된다. 후자는 열이 좀 덜 나고 값이 싼 장점이 있지만 제논 아크에 비해 태양광과의 유사도가 낮다. 모든 인공태양광 조사장치가 상당량의 UVB를 방출하기 때문에 세포독성이 매우

강한 UVB를 줄이기 위해서는 필터를 장착해야 한다. 세포 배양용 플라스틱 재료들이 UV 안정화제를 포함하기 때문에 시험분석 시 사용하는 것과 같은 96 well 플레이트 뚜껑을 통과하는 스펙트럼을 측정하여야 한다. 장착된 필터 또는 실험재료에 의해 여과된 스펙트럼 측정값은 표준화된 실외광을 벗어나지 말아야 한다. *In vitro* 3T3 NRU 광독성 시험법 검증에 사용되었던 필터를 사용한 광조사기의 여과된 스펙트럼 분포도는 별첨 3의 그림1과 같다.

- **광량 측정:** 광세기는 적절한 UV 측정기를 사용하여 광독성시험 전에 정기적으로 점검하여야 한다. 광세기는 시험에 사용하는 것과 같은 96 well 플레이트 뚜껑을 통과하는 스펙트럼을 측정한다. UV 측정기는 광원에 대하여 보정해야 한다. UV 측정기의 정상 작동 여부를 점검하며, 이를 위해 제 2의 참조용(reference) UV 측정기로 같은 방법으로 보정하여 사용할 것을 권장한다. 이상적으로는 시간 간격을 두어 스펙트럼 측정기를 사용하여 여과된 광원의 스펙트럼별 광세기를 측정하고 UV 측정기를 보정하여야 한다. UVA 영역에서 5 J/cm<sup>2</sup>의 광량은 Balb/c 3T3 세포에 대해 독성이 없으면서 화학물질을 활성화 시켜 광독성 반응을 일으키기에 충분한 것으로 밝혀졌다. 예를 들어 본 연구에서 50분 내에 5 J/cm<sup>2</sup>에 도달하기 위한 광세기가 1.7 mW/cm<sup>2</sup>이었다(별첨3 그림2). 만약 다른 세포주와 다른 광원을 사용하려면 세포에는 무해하면서 표준 광독성물질을 활성화 시키기에 충분한 광영역이 선택될 수 있도록 조사량을 보정한다. 이때 광 노출 시간은 다음과 같이 계산한다.

$$t(\text{분}) = \frac{\left[ \text{p-UV} \left( \frac{\text{J}}{\text{cm}^2} \right) \times 1000 \right]}{\left[ 80 \left( \frac{\text{mW}}{\text{cm}^2} \right) \times 60 \right]} \quad (1 \text{ J} = 1 \text{ Wsec})$$

## 나. 시험조건

### 1) 시험물질 농도

UV 조사(+Irr) 및 UV 비조사(-Irr) 시 시험물질의 농도범위는 용량 범위 결정시험을 통해 결정한다. 화학물질의 용해도는 광 노출 시간 또는 노출 과정에 따라 변화할 수 있기 때문에 처음과 60분 후(또는 계획된 어떤 처리 시간)에 용해도를 평가해 보는 것이 좋다. 또한 부적절한 배양조건, 강산성, 강알칼리성 화학물질에 의해 유도되는 독성을 피하기 위해 세포배양 시 pH는 6.5-7.8 범위 내에 있어야 한다. 시

시험물질의 최고 농도는 삼투압이나 pH 스트레스가 가해지지 않는 생리적 허용 범위 내에 있어야 한다. 시험물질에 따라 최고농도를 제한하는 요소로서 다른 물리화학적 특성들이 고려될 수도 있다. 상대적으로 불용성이며 포화농도에서 무독성인 물질에 대해서는 도달할 수 있는 최대농도에서 시험되어야 한다. 또한 일반적으로 어떠한 시험농도에서도 시험물질이 침전되는 것은 피해야 한다. 시험물질의 최대농도는  $1000 \mu\text{g/ml}$  그리고 삼투압은  $10 \text{ mmol}$ 을 초과해서는 안 된다. 일정한 희석비율로 8개의 시험물질 농도를 정한다. UV 비조사 시에는 세포독성이 없지만 UV 조사 시 세포독성이 강하게 나타나는 시험물질에 대한 정보(농도범위 결정시험 등으로부터 얻어진)가 있다면 보다 유용한 시험결과를 얻기 위해 UV 조사 시의 농도범위를 UV 비조사 시의 농도범위와 다르게 할 수 있다.

## 2) 대조군(controls)

- **세포의 UV 민감도** : 시험에 사용하는 세포에 대해서는 UV 조사량에 따른 민감도를 정기적으로(약 5계대마다) 점검한다. 점검 시에는 3T3 NRU 광독성시험에서 사용되는 광량보다 높은 용량이 포함된 여러 광량이 사용되어야 한다. 이 광량은 UV 측정기로 쉽게 정량된다. 세포는 3T3 NRU 광독성시험에서 사용된 동일한 밀도로 배양한 후 다음날 UV로 조사한다. 1일 후 neutral red 흡수정도로 세포 생존율을 결정한다. 세포독성이 없는 최대 광량(예 : 검증시험 시 UVA 영역에서  $5\text{J/cm}^2$ )은 표1의 표준물질들을 구별하는데 충분한 양이어야 한다.
- **시험의 점검(UV 민감도)** : UV 조사 시 음성대조군 및 용매대조군의 세포 생존율은 UV 비조사 시 세포 생존율의 80% 이상이어야 한다.
- **용매대조군의 생존율** : 용매대조군에서 얻어진 neutral red의 절대 흡광도값( $\text{OD}_{540 \text{ NRU}}$ )은 각 well에 분주된  $1 \times 10^4$  세포가 2일간의 시험기간 동안 정상적으로 분열하면서 성장했음을 보여주는 지표이다. 무처리 대조군의  $\text{OD}_{540 \text{ NRU}}$ 은  $\geq 0.4$  이어야 한다.
- **양성대조군** : 매 시험마다 chlorpromazine(CPZ)같은 이미 알려진 광독성물질을 양성대조물질로 하여 동시에 시험해야 한다. CPZ를 이용하여 표준작업수순서에 따라 시험하였을 경우 다음과 같은 시험결과가 얻어져야 한다. UV 조사조건에서  $\text{IC}_{50}=0.1-2.0 \mu\text{g/ml}$ , UV 비조사조건에서  $\text{IC}_{50}=7.0-90.0 \mu\text{g/ml}$ , PIF(photo irritation factor)  $> 6$ 이어야 한다. 또한 양성대조군에 대한 시험결과를 지속적으로 모니터링 한다(시험물질의

종류나 용해도의 특성을 고려하여 CPZ 대신 다른 광독성물질도 양성 대조물질로 사용할 수 있다).

표 1. UV 조사 표준물질

화학물질명 (CAS 번호)	PIF	MPE	Absorption Peak	용 매
Amiodarone HCL [19774-82-4]	>3.25	0.27-0.54	242nm 300nm (shoulder)	ethanol
Chlorpromazine HCL[69-09-0]	>14.4	0.33-0.63	309nm	ethanol
Norfloxacin [70458-96-7]	>71.6	0.34-0.90	316nm	acetonitrile
Anthracene [120-12-7]	>18.5	0.19-0.81	356nm	acetonitrile
Protoporphyrin IX, Disodium [50865-01-5]	>45.3	0.54-0.74	402nm	ethanol
L-Histidine [7006-35-1]	no PIF	0.05-0.10	211nm	water
Hexachlorophene [70-30-4]	1.1-1.7	0.00-0.05	299nm 317nm (shoulder)	ethanol
Sodium lauryl sulfate [151-21-3]	1.0-1.9	0.00-0.05	no absorption	--

## 다. 시험과정

### 1) 시험 1일

배지 100  $\mu\text{l}$ 를 96 well 플레이트 외곽 well에 첨가하여 blank를 만들고, 나머지 well에는 배지에 부유시킨 세포액( $1 \times 10^5$  cells/ml) 100  $\mu\text{l}$ 를 첨가한다(= $1 \times 10^4$  cells/well). 각 시험물질에 대해 2개(UV 조사 및 비조사)의 플레이트를 준비한다. 플레이트를 24시간 배양하여 각 well 바닥면적의 반 정도가 단층배양세포로 충분히 채워지도록 한다.

### 2) 시험 2일

배지를 버리고 완충액 150  $\mu\text{l}$ 로 조심스럽게 세척한다. 적절한 농도의 시험물질 또는 용매를 포함하는 완충액 100  $\mu\text{l}$ 를 각 well에 첨가하고 CO<sub>2</sub> 배양기에서 60분간 배양한다. 시험물질은 8가지 농도를 사용한다. 배양 후 플레이트 하나는 어두운 곳에 50분 동안 방치하고, 다른 플레이트는 실온에서 50분 동안 UV를 조사한다. 플레이트 뚜껑을 덮은 채로 조사하며, 조사량은 세포독성이 없는 최대량으로 한다. 시험물질 용액을 버리고 150  $\mu\text{l}$ 의 완충액으로 조심스럽게 두 번 세척한다. 배지를 첨가하고 하룻밤(18-22 시간) 동안 배양한다.

### 3) 시험 3일

#### - 현미경 관찰

위상차 현미경을 사용하여 세포의 성장, 형태, 단층배양 정도를 조사하고 세포 형태 변화와 세포 성장에 대한 영향을 기록해 둔다.

#### - Neutral red 흡수 시험

가온한 완충액 150  $\mu\text{l}$ 로 세포를 조심스럽게 세척하고, 세척액을 제거한 후, neutral red 배지(혈청을 함유하지 않은 배지에 neutral red를 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 녹임) 100  $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 CO<sub>2</sub> 배양기에서 3시간 동안 배양한다. Neutral red 배지를 제거하고 완충액 150  $\mu\text{l}$ 로 세척한 후 완충액을 제거한다. Neutral red 추출액 150  $\mu\text{l}$ (물:에탄올:아세트산 = 49:50:1)를 각 well에 첨가하고 세포로부터 neutral red가 용출되어 균질한 용액이 형성될 때까지 마이크로타이터 플레이트 교반기(microtiter plate shaker) 위에서 10분 동안 천천히 교반시킨다. 분광광도계(spectrophotometer)를 사용하여 540 nm에서 neutral red 용출액의 흡광도를 측정한다(기준을 잡기 위해 blank를 사용한다).

## 5. 시험자료 및 보고

### 가. 시험자료

- 1) 시험자료는 광조사 유무 시 얻어지는 농도 반응을 분석하여 가능하면 시험물질의 IC<sub>50</sub>(세포 생존율이 50%로 감소되는 농도)값을 구한다. 만약 세포독성이 나타나면 농도 범위와 결과 값 모두 시험결과에서 얻어지는 곡선에 포함될 수 있도록 조정한다.
- 2) 1차 실험에서 명백한 양성 또는 음성 결과를 나타내는 경우 1회 이상 용량설정 예비시험으로 충분하다.
- 3) 모호하거나 불명확한 결과들은 추가 실험을 통해 명확히 한다. 이와 같은 경우 농도범위, 농도간격, 사전 배양시간, 광조사 시간 등의 실험 조건 변경을 고려해 볼 수 있다. 물에 불안정한 화학물질의 경우 광조사 시간을 줄이는 것이 적절할 수 있다.

### 나. 시험결과 평가

- 1) PIF(photo irritation factor)값 또는 MPE(mean photo effect)값을 계산하여 시험결과를 평가한다.
- 2) 연속 용량 반응 곡선을 이용하여 비연속적인 용량 반응 값을 측정하고 광 세포독성 측정값을 구한다.
- 3) PIF값은 다음과 같은 수식을 이용하여 계산한다.

$$\text{PIF} = \frac{\text{IC}_{50}(-\text{Irr, UV 비조사조건})}{\text{IC}_{50}(+\text{Irr, UV 조사조건})}$$

광조사 유무로 IC<sub>50</sub>를 계산할 수 없다면, 시험물질에 대한 PIF값은 결정할 수 없다.

- 4) MPE값은 농도 반응 곡선의 차이를 기초로 하고 있다. MPE는 n개의 PE값 가중평균으로 정의된다.

$$MPE = \frac{\sum_{i=1}^{n_r} W_{i,r} PE_{C_i,r}}{\sum_{i=1}^{n_r} W_{i,r}}$$

- PE<sub>c</sub> = RE<sub>c</sub> × DE<sub>c</sub>
- PE<sub>c</sub> : 농도 c에서의 PE(photo effect, 광효과)
- RE<sub>c</sub> (농도 c에서의 RE(response effect, 반응효과) = R<sub>c</sub>(-Irr)-R<sub>c</sub>(+Irr)  
: UV 조사 유무 시 관측되는 반응값의 차이
- DE<sub>c</sub> (농도 c에서의 Dose Effect, 용량효과)

$$DE_c = \frac{C/C^* - 1}{C/C^* + 1}$$

- C\* (equivalence concentration)  
: UV 조사(+Irr) 시 반응과 UV 비조사(-Irr) 시 반응이 같은 시험물질 농도
- w<sub>i</sub> (가중치 값) = MAX {R<sub>i</sub>(+Irr), R<sub>i</sub>(-Irr)}  
: UV 조사 시(+Irr)와 UV 비조사(-Irr) 시 반응값의 최대값

DE<sub>c</sub>(용량효과)는 C(실제농도)와 C\*가 비슷하면 0에 가까운 값이 되고 C\*가 C(실제농도)보다 상대적으로 매우 크거나 작을 때는 1이 된다. UV 조사 시 반응값이 UV 비조사 시의 반응값보다 매우 크거나 작으면 용량효과는 1로 한다. MPE값이 0.15(cut-off value) 보다 크면 광독성으로 분류한다.

- 5) PIF값 및 MPE값은 소프트웨어(Phototox 2.0, ZEBET at the BfR, Berlin Germany)를 사용하여 계산할 수 있다. (Source: <http://www.oecd.org>)

다. 시험결과 해석

- 1) 시험결과의 해석은 표2와 같으며, PIF 값으로 5이상 또는 MPE 값이 0.15 이상이면 광독성 양성으로 판정한다.



- 2) 본 시험을 확립하기 위해서는 먼저 표준시험물질로 광독성을 평가하여 PIF나 MPE값이 표1에 언급된 값에 근접해야 한다.

표2 시험결과 해석

해석	PIF값	MPE값
광독성 없음 (No phototoxicity)	$PIF < 2$	$MPE < 0.1$
광독성 가능성 있음 (Probable phototoxicity)	$2 < PIF < 5$	$0.1 < MPE < 0.15$
광독성 있음 (Phototoxicity)	$PIF > 5$	$MPE > 0.15$

라. 시험자료 해석

- 1) 최고농도에서만 광독성이 나타나면(특히 화학물질이 수용성인 경우), 위험성 평가를 위해 피부 흡수 및 축적, 기타 시험자료(예: *in vitro* 동물피부나 인체피부시험, 피부모델) 등을 고려할 필요가 있다.
- 2) 시험물질이 자외선 노출여부와 관계없이 독성이 나타나지 않고, 용해도가 낮아 농도설정이 어려운 경우 본 시험 적용보다는 다른 시험법을 고려해야 한다.

6. 결과 보고

가. 시험보고서에는 다음과 같은 정보를 포함하여야 한다.

- 1) 시험물질
  - 시험물질의 관별자료(일반명, IUPAC, CAS 번호)
  - 물리적 성상 및 순도
  - 시험과 관련된 물리화학적 성상
  - 자외/가시부 흡수스펙트럼(UV/Vis absorption spectrum)
  - 안정성, 광안정성 (알고 있는 경우)

## 2) 용매

- 선택사유
- 용매에 대한 시험물질 용해도
- 시험배지에서 용매의 백분율

## 3) 세포

- 세포의 종류 및 근원
- 마이크로플라스마 존재 여부
- 세포계대수 (정확한 계대수를 알고 있는 경우)
- 세포의 광조사 민감도 (*In vitro* 3T3 NRU 광독성시험에 사용한 인공태양광조사기로 측정)

## 4) 시험조건 1: 시험물질 처리 전후의 배양조건

- 배지의 종류 및 조성
- 배양조건 (CO<sub>2</sub> 농도, 온도, 습도)
- 배양기간 (처리 전, 처리 후)

## 5) 시험조건 2: 시험물질 처리조건

- 시험물질 농도 설정 근거 (UV 조사 및 비조사시)
- 시험물질의 용해도 제한이 있는 경우와 세포독성이 없는 경우, 시험물질 최고농도에 대한 근거
- 시험물질 처리배지에 대한 종류 및 조성(완충액)
- 시험물질 처리기간

## 6) 시험조건 3: 광조사

- 광원의 선택이유
- 광원과 인공태양광조사기의 제조사 및 종류
- 광원의 스펙트럼 특성
- 필터의 투과 및 흡수 특성
- 인공태양광조사기의 특성 및 보정
- 광원과 시험계간의 거리
- UVA 광세기: mW/cm<sup>2</sup>로 표시
- 자외선/가시광선 노출 기간

- UVA 광량:  $J/cm^2$ 로 표시
- 광조사 시 세포 배양 온도 및 어두운 곳에서의 세포배양 온도

#### 7) 시험조건 4: Neutral red 생존율 시험

- Neutral red 처리배지의 조성
- Neutral red 배양기간
- 배양조건( $CO_2$  농도, 온도, 습도)
- Neutral red 추출 조건(추출액, 기간)
- Neutral red 광도를 읽는 분광광도기의 파장
- 이차파장(사용한 경우)
- 분광광도기 blank 내용물(사용한 경우)

#### 8) 결과

- 시험물질 각각의 농도와 용매대조군에서의 세포생존율(평균값으로 표시)
- 광조사 유무에 따른 농도 반응 곡선(시험물질 농도에 따른 상대 세포 생존율)
- 농도 반응 곡선 분석: 가능하면  $IC_{50}$  계산[ $IC_{50}(+Irr)$ ,  $IC_{50}(-Irr)$ ]
- PIF 또는 MPE의 계산을 이용하여 광조사 유무에 따른 두 농도 반응 곡선 비교
- 용매대조군의 시험 적용기준
- 절대생존율(광조사 유무에 따른 neutral red 흡광도)
- 음성대조군과 용매대조군의 기록(평균, 표준편차)
- 양성대조군의 시험 적용기준
- 양성대조군의  $IC_{50}(+Irr)$ ,  $IC_{50}(-Irr)$ , PIF/MPE
- 양성대조군의 기록:  $IC_{50}(+Irr)$ ,  $IC_{50}(-Irr)$ , PIF/MPE, 평균, 표준편차

#### 9) 결과 토의

#### 10) 결론

## 별첨 1

### 용어정의(definition)

#### 광세기(Irradiance):

자외선 또는 가시광선이 표면에 작용하는 세기로  $W/m^2$  또는  $mW/cm^2$ 으로 측정된다.

#### 광량(Dose of light):

자외선 또는 가시광선이 표면에 작용하는 양(광세기×시간)으로 표면적 당 Joule로 표시된다. (예:  $J/m^2$ ,  $J/cm^2$ )

#### 자외선 파장대(UV light wavebands):

CIE(commission internationale de L'Eclairage) 권고에 따라 UVA(315-400nm), UVB(280-315nm), UVC (100-280nm)로 구분한다. UVA와 UVB를 320nm에서 구분하기도 하고 UVA를 340nm에서 UVA1과 UVA2로 나눌 수도 있다.

#### 세포 생존율(Cell viability):

세포 전체 활성을 측정하는 지표로서, 시험에 사용된 종말점과 시험설계에 따라 총세포수 및 세포 생명력과 관련이 있다(예: 세포 라이소솜으로 neutral red 염색액이 흡수되는 정도).

#### 상대 세포 생존율 (Relative cell viability):

용매대조군(또는 음성대조군)에 대한 세포 생존율을 표시하는 것으로 시험 물질을 처리하지 않은 전체 시험과정(Irr +/-)을 거쳐서 나온 결과이다.

#### PIF (Photo-irritation-factor, 광자극지수):

시험물질 처리 후 자외선 조사유무에 따른  $IC_{50}$  값을 비교하여 생성된 지수

#### $IC_{50}$ :

세포의 생존율이 50%로 감소되는 시험물질의 농도

#### MPE (Mean photo effect, 평균 광효과):

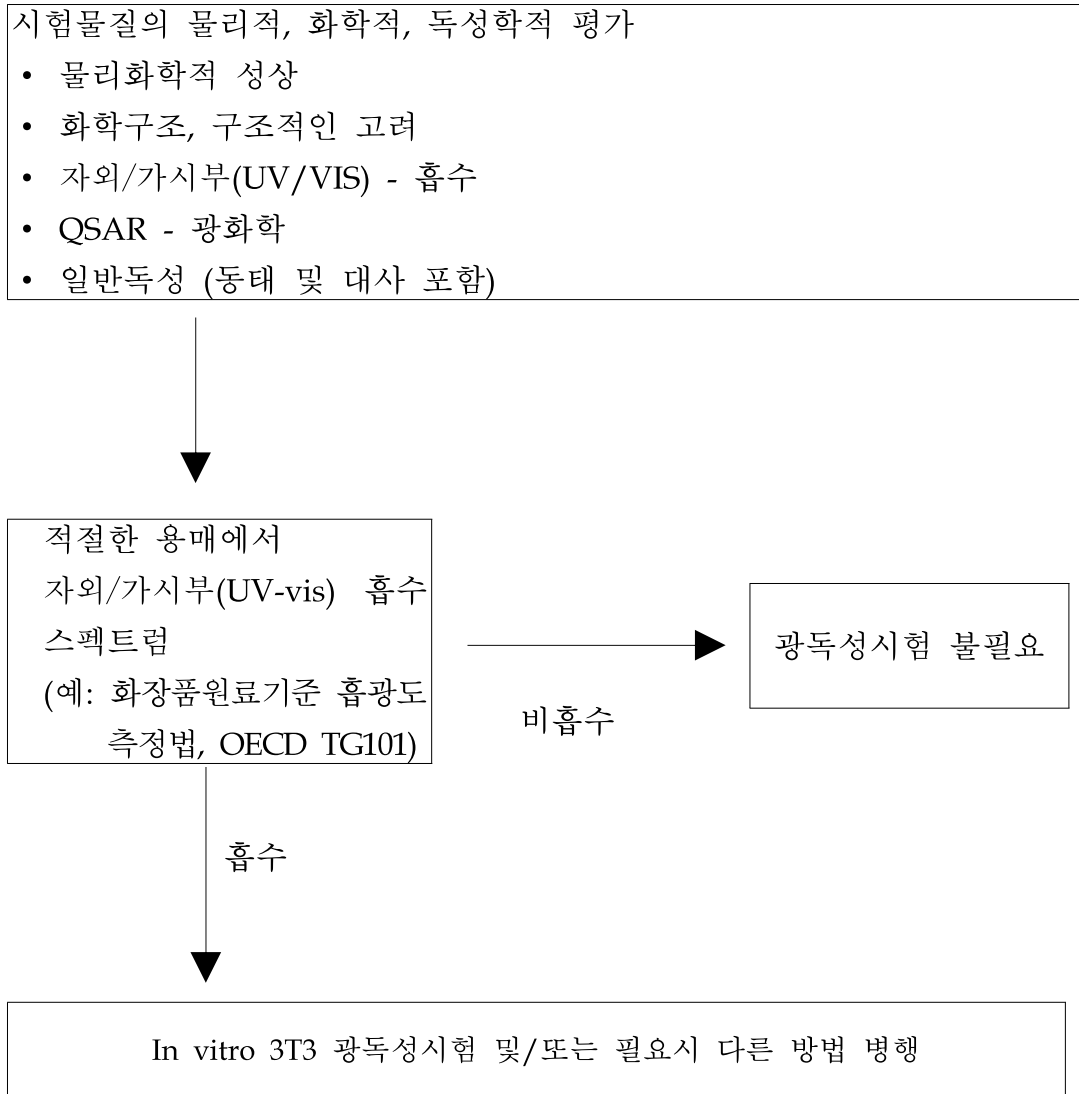
시험물질 처리 후 자외선 조사유무에 따른 농도 반응 곡선을 수학적으로 계산하여 얻은 값

#### 광독성(Phototoxicity):

화학물질이 피부에 적용되거나 전신투여 된 후 피부가 빛에 노출되었을 때 나타나는 급성독성반응

별첨 2

화학물질 광독성시험의 흐름도



별첨 3

그림1. 광조사기의 스펙트럼 분포도

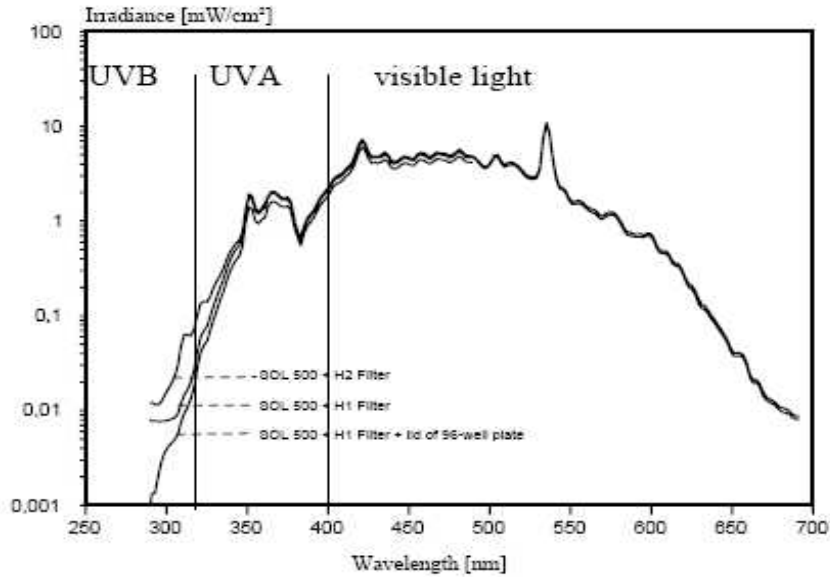
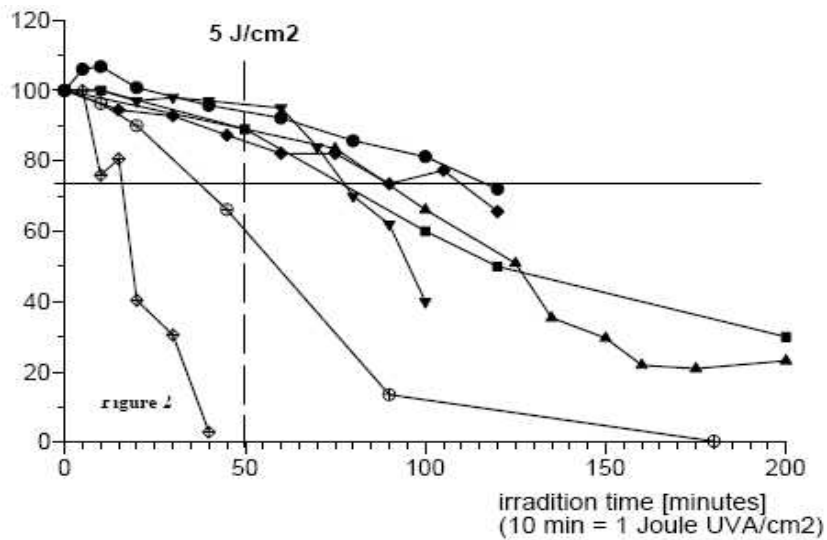


그림 1은 필터를 사용한 광조사기의 여과된 스펙트럼 분포도의 한 예이다. 이 그림은 *in vitro* 3T3 NRU 광독성시험법 검증을 위해 사용되었던 광조사기(doped metal halide source)로부터 얻은 결과이다. 2개의 다른 필터(H1 필터, H2 필터)와 플레이트 뚜껑을 닫았을 때의 추가 여과효과를 보여준다. H2 필터는 많은 양의 UVB에 견딜 수 있는 시험계(피부모델시험, RBC 용혈시험)에서만 사용되었고, 3T3 NRU 광독성시험에는 H1 필터가 사용되었다. 96 well 플레이트 뚜껑의 추가 여과기능이 UVB 범위에서 주로 관찰되며, amiodarone과 같은 화학물질이 여기 되기에 충분한 UVB가 여전히 남아있음을 보여준다.

그림2. Balb/c 3T3 세포 광조사 민감도(UVA로 측정)

세포 생존율(%)



이 그림은 7개의 실험실에서 3T3 NRU 광독성시험법 검증을 위해 UVA 범위에서 측정된 세포에 대한 광조사 민감도이다. Open symbol로 표시된 2개의 곡선은 나이트 세포(계대가 많이 이루어진 세포)에서 얻어진 값으로, 새로운 세포주로 교체되어야 한다. Bold symbol로 표시된 곡선은 광조사 내성이 있는 세포를 나타낸다. 이 그림에서 세포독성이 없는 최고 조사량은 UVA 영역에서 5J/cm<sup>2</sup>(수직선)이며, 수평선은 UVA 영역에서 5J/cm<sup>2</sup>로 조사했을 때의 시험 가능한 최소 세포 생존율을 나타내고 있다.

## 참고문헌

- (1) OECD Test guideline TG 432 In vitro 3T3 NRU phototoxicity
- (2) Lovell W.W. (1993). A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential. Toxic. In Vitro 7: 95-102.
- (3) Santamaria, L. and Prino, G. (1972). List of the photodynamic substances. In "Research Progress in Organic, Biological and Medicinal Chemistry" Vol. 3 part 1. North Holland Publishing Co. Amsterdam. p XI-XXXV.
- (4) Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O., and Sladowski, D. (1994). *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM Workshop 2. ATLA, 22, 314-348.
- (5) Spikes, J.D. (1989). Photosensitization. In "The science of Photobiology" Edited by K.C. Smith. Plenum Press, New York. 2nd edition, p 79-110.
- (6) OECD (1997) Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 7 "Guidance Document On Direct Phototransformation Of Chemicals In Water" Environment Directorate, OECD, Paris.
- (7) Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer, F. Moore, L., Pape, W., Pfannbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W., and Willshaw, A. (1994). EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. Toxic. In Vitro 8, 793-796.
- (8) Anon (1998). Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 November 1997, ATLA, 26, 7-8.
- (9) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., Pechovitch, G. De Silva, O., Holzhütter, H.G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W., and Brantom, P. (1998). The international EU/COLIPA *In vitro* phototoxicity



- validation study: results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. *Toxic. In Vitro* 12, 305-327.
- (10) OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test Guideline Proposal, Berlin, 30<sup>th</sup> - 31<sup>st</sup> October 2001, Secretariat's Final Summary Report, 15<sup>th</sup> March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat.
- (11) Borenfreund, E., and Puerner, J.A. (1985). Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Lett.*, 24, 119-124.
- (12) Hay, R.J. (1988) The seed stock concept and quality control for cell lines. *Analytical Biochemistry* 171, 225-237.
- (13) Lambert L.A, Wamer W.G., and Kornhauser A. (1996) Animal models for phototoxicity testing. In "Dermatotoxicology", edited by F.N. Marzulli and H.I. Maibach. Taylor & Francis, Washington DC. 5th Edition, p 515-530.
- (14) Tyrrell R.M., Pidoux M (1987) Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes. *Cancer Res.*, 47, 1825-1829.
- (15) ISO 10977. (1993). Photography - Processed photographic colour films and paper prints - Methods for measuring image stability.
- (16) Sunscreen Testing (UV.B) TECHNICALREPORT, CIE, International Commission on Illumination, Publication No. 90, Vienna, 1993, ISBN 3 900 734 275.
- (17) ZEBET/ECVAM/COLIPA - Standard Operating Procedure: *In vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test. Final Version, 7 September, 1998. 18 pgs.
- (18) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., De Silva, O., Holzhütter, H.G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., and Pfannenbecker, U. (1998) A study on UV filter chemicals from Annex VII of the European Union *Directive 76/768/EEC*, in the *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test. *ATLA* 26, 679-708.
- (19) Holzhütter, H.G., and Quedenau, J. (1995) Mathematical modeling of cellular responses to external signals. *J. Biol. Systems* 3, 127-138.
- (20) Holzhütter, H.G. (1997). A general measure of *in vitro* phototoxicity

derived from pairs of doseresponse curves and its use for predicting the *in vitro* phototoxicity of chemicals. ATLA, 25, 445-462.

(21) [http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en\\_2649\\_34377\\_2349687\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html)

### III. 국소림프절시험법(LLNA)

#### 1. 개요

- 가. 국소림프절시험법(Local Lymph Node Assay, LLNA)은 마우스를 이용한 피부감작성시험법으로, 기니픽을 이용한 GPMT(guinea pig maximization test)와 Buehler시험법을 대체할 수 있는 시험법이다.
- 나. 본 시험법은 과학기술의 발전과 동물복지 측면에 장점이 있으며, 피부감작유도 연구와 용량반응평가에 정량적인 자료를 제공한다.

#### 2. 사전 고려사항

- 가. LLNA는 피부감작물질을 확인하는 대체시험법이다. 본 시험법은 기니픽을 이용한 방법을 완전하게 대체하는 것은 아니지만 LLNA 시험결과 양성 혹은 음성으로 판정되었을 때 더 이상 추가 확인 작업을 하지 않아도 된다.
- 나. LLNA는 *in vivo* 방법이지만 접촉성 감작능을 평가하는데 필요한 동물수를 감소시킬 수 있도록 개선된 시험법이다. LLNA는 감작 유도단계에서 시험물질에 의해 활성화되는 면역 반응을 근거로 한다. 기니픽을 이용한 피부감작성시험법과는 달리 LLNA는 야기에 의해 유도되는 피부과민반응을 일으키는 과정이 요구되지 않으며, 면역보조제를 사용하지 않아 동물의 스트레스를 줄일 수 있다. LLNA는 기니픽을 이용한 피부감작성시험법에 비해 장점이 있지만 일부 금속물질에서 위 음성으로, 일부 피부자극물질에서 위 양성으로 관찰되는 경우도 있어 기존의 기니픽을 이용한 피부감작성시험법 이용이 필요할 수도 있다.
- 다. 본 시험법은 방사성동위원소를 사용하므로 방사성동위원소의 사용, 저장, 운반, 폐기 및 기타 취급상의 기준을 준수하여야 한다.

### 3. 시험법의 원리

LLNA는 감작물질이 도포부위에서 가까운 림프절 내 림프구의 증식을 유도한다는 원리에 근거한 시험법이다. 이러한 증식은 도포물질의 농도 및 알레르기 유발능에 비례하며, 감작능을 객관적이고 정량적으로 측정할 수 있도록 해준다. LLNA는 시험군의 증식도와 용매대조군의 증식도를 SI(stimulation Index, 자극지수)로 비교 평가한다. SI는 용매대조군과 시험군의 증식 비율로 결정하고, 시험물질의 피부감작물질 가능성에 대한 판정은 SI가 적어도 3이상 이어야 한다. 본 시험법은 세포의 증식을 측정하기 위해 방사성동위원소를 이용한다. 하지만 증식도를 평가하기 위하여 충분한 자료와 시험법에 대한 적절한 과학적 근거가 있다면 다른 방법도 적용될 수 있다.

### 4. 시험방법

#### 가. 시험의 개요

##### 1) 동물종의 선택

일반적으로 CBA/Ca 또는 CBA/J 중 마우스로 임신 경험이 없는 암컷을 사용한다. 8-12 주령의 마우스를 사용하며, 동물의 체중은 평균체중으로부터 20%를 넘지 않도록 한다. LLNA 결과로 종 또는 성의 차이가 없다는 충분한 자료가 있으면 기타 다른 마우스 종이나 수컷을 사용할 수 있다.

##### 2) 동물 사육조건

실험동물은 각각 구분하여 개별사육을 한다. 실험동물실의 온도는  $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , 상대습도는 50~60%를 유지하도록 한다. 인공조명을 사용하며 조명시간은 12시간 주기로 명암을 조절한다. 식이는 일반적인 실험동물 사료를 사용하고, 음수와 함께 제한 없이 공급한다.

##### 3) 동물의 준비

동물은 무작위로 선별하고, 개별적으로 식별할 수 있게 한다(단 귀에 표시해서는 안 됨). 실험환경에서 투여시작 전 적어도 5일간 순화기간을

둔다. 시험물질 처치 시작 전에 동물 피부에 병변이 없는지 검사한다.

#### 4) 신뢰도 검사

음성대조군과 양성대조군을 두고 상황에 따라 무처치대조군을 포함할 수 있다. 양성대조물질로는 hexyl cinnamic aldehyde(CAS No. 101-86-0)와 mercaptobenzothiazole(CAS No. 149-30-4)이 권장된다. 양성대조물질의 농도는 명확한 양성반응을 나타내지만 과도한 반응을 유발하지 않는 농도로 선택한다. 양성대조군은 음성대조군보다 SI가 3이상 예상되는 농도에서 양성반응을 나타내야 한다. 그러나 위의 기준에 합당한 물질로 타당한 근거가 있으면 다른 물질을 양성대조물질로 사용할 수 있다. 일반적으로 매 시험마다 양성대조군을 둔다. 그러나 시험기관에서 과거 6개월 이상 지속적으로 시험하였을 때 일정한 결과가 도출된 양성대조물질에 대한 충분한 자료가 있다면 매 시험마다 양성대조군을 포함하지 않아도 된다. 단, 이러한 양성대조군에 대한 시험을 생략하는 기간이 6개월을 넘어서는 안 된다. 일반적으로 일정한 반응을 나타내는 양성대조물질의 용매(예: acetone:olive oil 등)를 사용하지만 이외 다른 용매를 사용하는 경우는 이 용매가 양성대조물질의 반응에 영향을 주는지 사전 검사하여야 한다.

### 나. 시험 과정

#### 1) 동물수와 투여농도

투여농도는 최소한 3가지 농도로 하며, 군당 최소 4마리의 동물을 사용한다. 용매만을 투여한 음성대조군과 적절한 양성대조군이 포함되어야 한다. 동물 개체별 자료를 얻고자 하는 경우, 군당 최소 5마리의 동물을 사용한다. 농도는 100%, 50%, 25%, 10%, 5%, 2.5%, 1%, 0.5% 등의 농도에서 순차적으로 선택한다. 3개의 연속된 농도를 선택할 때 단회투여독성시험과 피부자극시험 자료를 고려하고, 최고농도는 전신독성 및 과도한 국소 피부자극을 피할 수 있는 최대농도로 한다. 대조군은 시험물질을 처치하지 않는 것을 제외하고 시험군과 동일한 방법으로 실험한다.

시험물질을 도포하기에 가장 적절한 용액 또는 현탁액을 만들기 위해 최대한 적용할 수 있는 농도와 용해도를 고려하여 용매를 선택한다. 용매는 acetone/olive oil (4:1 v/v)(AOO), dimethylformamide(DMF), methyl ethyl ketone(MEK), propylene glycol(PG), dimethyl

sulphoxide(DMSO) 등이 권장되며, 과학적인 충분한 근거가 있으면 다른 용매도 사용할 수 있다. 경우에 따라서는 인체에 적용 시 사용되는 용매 및 시험물질이 특정 용매에 함유되어 판매되고 있는 경우 그 용매를 추가 대조군으로 사용한다. 피부를 잘 적시고 즉시 마르지 않도록 친수성 성분이 용매에 잘 혼합될 수 있게 특별히 주의를 기울이고 완전한 수용성 용매는 피한다.

## 2) 시험 일정

### - 시험 1일

각 시험동물의 개체를 식별하고, 체중을 기록한다. 적절하게 희석된 시험물질, 용매, 양성대조물질을 각각 양쪽 귀의 뒷(배)면에 25  $\mu$ l씩 1회 도포한다.

### - 시험 2일 및 3일

첫날 시험을 반복한다.

### - 시험 4일 및 5일

도포하지 않는다.

### - 시험 6일

동물의 체중을 기록하고, 20 $\mu$ Ci(7.4e+5 Bq)  $^3$ H-methyl thymidine이 함유된 phosphate-buffered saline(PBS) 250 $\mu$ l를 시험군과 용매대조군의 마우스 꼬리정맥에 주사한다. 또는 2 $\mu$ Ci(7.4e+4 Bq)  $^{125}$ I-iododeoxyuridine과  $10^{-5}$ M fluorodeoxyuridine이 함유된 PBS 250  $\mu$ l를 마우스의 꼬리정맥에 주사한다. 5시간 후 마우스를 희생시켜 양쪽 이개 림프절을 군별 또는 개체별로 채취하여 합한다.

## 3) 세포 부유액의 준비

림프절에서 단일세포군을 얻기 위해 세포를 물리적으로 유리시킨다(예: 간극 크기가 200  $\mu$ m인 스테인리스 망). 림프절 세포를 PBS로 2회 세척하고 5% trichloroacetic acid(TCA) 3 ml를 가하여 4 $^{\circ}$ C에서 18시간 동안 방치하여 침전시킨다. 세포침전물에 TCA 1 ml를 가하여 부유시킨 다음  $^3$ H-계수(counting)를 위해 신틸레이션(scintillation) 용액 1 ml가

포함된 신틸레이션 바이알로 옮기거나  $^{125}\text{I}$ -계수가 가능한 감마계수관 (gamma counting tube)으로 옮긴다.

4) 세포 증식능 확인(결합된 방사성동위원소 측정)

$^3\text{H}$ -methyl thymidine의 결합은  $\beta$ -scintillation counting으로 측정하고,  $^{125}\text{I}$ -iododeoxyuridine의 결합은  $^{125}\text{I}$ -계수로 측정하여 DPM (disintegration per minute)으로 나타낸다. 방사성동위원소 결합 정도를 DPM/군 또는 DPM/개체로 나타낸다.

다. 동물의 관찰

1) 독성증상 관찰

적용부위에서의 국소자극, 전신독성 등 독성증상을 하루에 한번 주의 깊게 관찰하여 개체별로 기록한다.

2) 체중

시험 첫째 날과 부검 일에 각각 측정하여 기록한다.

## 5. 결과 계산

가. 결과는 Stimulation Index(SI)로 나타낸다. 군별로 합한 경우 SI는 시험군의 DPM을 용매대조군 DPM으로 나눈 값이다. 개체별로 합한 경우 SI는 시험군 또는 양성대조군 평균 DPM을 용매대조군의 평균 DPM으로 나누어 계산한다. 용매대조군의 평균 SI는 1이다.

나. 개체별로 합하여 SI를 계산한 경우 자료의 통계분석이 가능하다. 적절한 통계분석법의 선택을 위해 분산의 편재 가능성, 자료의 변환, 비모수통계분석이 필요한지 검토해야 한다. 자료를 올바르게 해석하기 위해서는 시험군과 용매대조군의 모든 개체별 자료를 평가하여 신뢰구간을 고려한 최적의 용량 반응 곡선을 구한다. 전체자료를 검토하였을 때 비정상적으로 크게 벗어난 자료가 있으면 평균대신 중앙값을 사용하는 등 대체할 수 있는 분석방법을 고려하거나 그 자료를 삭제할 필요성도 생각해보아야 한다.

다. 용량-반응 정도와 통계적인 유의성을 고려하여 SI가 3이상이면 양성으로 판정한다.

라. 판정 결과를 명확히 하려면 기존에 알려진 감작물질과의 구조적 유사성이 있는지, 심한 피부자극을 유발하는지, 용량 반응 관계의 특성 등 다양한 시험물질의 성상에 대한 검토도 병행되어야 한다.

## 6. 자료 및 보고

### 가. 자료

자료는 평균 및 개개의 DPM 값과 각각의 농도에 대한 SI 값을 표로 요약한다.

### 나. 시험보고서

시험보고서에는 다음과 같은 정보를 포함하여야 한다.

#### 1) 시험물질

- 일반정보(CAS 번호, 시험물질 입수처, 순도, 불순물 함유여부, lot 번호 등)
- 물리적 성상, 물리화학적 특성(휘발성, 안정성, 용해도)
- 혼합물인 경우 조성과 구성성분의 비율

#### 2) 용매

- 일반정보(순도, 농도, 사용된 양)
- 선택사유

#### 3) 실험동물

- 사용된 마우스의 종



- 동물의 미생물 모니터링 자료
- 동물 수, 주령, 성별
- 동물 입수처, 사육 조건, 사료 등

#### 4) 시험조건

- 시험물질의 준비와 도포에 대한 상세정보
- 농도 선택사유(용량 결정시험이 수행 되었다면 그 결과 포함)
- 용매, 시험물질의 도포농도, 도포물질의 총량
- 식이 및 음수에 대한 상세정보 (사료의 형태, 제조회사, 음수원)

#### 5) 신뢰성 점검

- 시험물질, 농도, 용매 정보를 포함한 최근 신뢰성 점검 자료
- 시험기관에서 사용해 온 양성대조군과 음성대조군 자료

#### 6) 결과

- 시험 시작 및 종료 시 동물의 체중
- 군별일 경우 평균(또는 중앙값) DPM에 대한 표, 개체별일 경우 DPM에 대한 표, 대조군을 포함하는 각 군의 SI 값
- 통계분석 자료
- 시험기간 중 각 동물의 도포부위 피부자극을 포함한 독성증상 및 발현시기

#### 7) 토의

- 시험결과, 용량 반응분석, 통계분석에 대한 토의
- 시험물질의 피부감작성 여부에 대한 결론

### 참고문헌

- (1) OECD Test guideline TG 429 Skin sensitization: Local lymph node assay
- (2) Kimber, I. and Basketter, D.A. (1992). The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary.

- Food and Chemical Toxicology 30, 165-169.
- (3) Kimber, I. Dearman, R.J. Scholes E.W, and Basketter, D.A (1994).  
The local lymph node assay: developments and applications.  
Toxicology, 93, 13-31.
  - (4) Kimber, I. Hilton, J. Dearman, R.J. Gerberick, G.F. Ryan, C.A.  
Basketter, D.A. Lea, L. House, R.V. Ladies, G.S. Loveless, S.E.  
Hastings, K.L. (1998). Assessment of the skin sensitisation potential  
of topical medicaments using the local lymph node assay: An  
interlaboratory exercise. Journal of Toxicology and Environmental  
Health, 53, 563-579.
  - (5) OECD (1992). Guideline 406 Skin Sensitisation.
  - (6) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996). The local lymph node  
assay: status of validation. Food and Chemical Toxicology, 34, 999-1002.
  - (7) Basketter, D.A. Gerberick, G.F. Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996).  
The local lymph node assay A viable alternative to currently  
accepted skin sensitisation tests. Food and Chemical Toxicology, 34, 985-997.
  - (8) Basketter, D.A. Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998). Strategies for  
identifying false positive responses in predictive sensitisation tests.  
Food and Chemical Toxicology. (in press) 36, 327-333.
  - (9) Van Och, F.M.M, Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J., Van  
Loveren, H. (2000). A quantitative method for assessing the  
sensitising potency of low molecular weight chemicals using  
a local lymph node assay: employment of a regression method that  
includes determination of uncertainty margins. Toxicology 146, 49-59.
  - (10) Dearman, R.J. Hilton, J. Evans, P. Harvey, P. Basketter, D.A. and  
Kimber, I. (1998). Temporal stability of local lymph node assay  
responses to hexyl cinnamic aldehyde. Journal of Applied Toxicology 18,  
281-284
  - (11) National Institute of Environmental Health Sciences (1999). The  
murine local lymph node Assay: A test method for assessing the  
allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The  
results of an independent peer review evaluation coordinated by the  
Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative  
Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center

for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494, Research Triangle Park, N.C. (<http://iccvam.niehs.nih.gov>).

- (12) OECD (2002). Guideline 404 Acute Dermal Irritation/Corrosion.
- (13) Basketter, D.A. Selbie, E. Scholes, E.W. Lees, D. Kimber, I. and Botham, P.A. (1993). Results with OECD recommended positive control sensitisers in the maximisation. Buehler and local lymph node assays. *Food and Chemical Toxicology*, 31, 63-67.
- (14) Basketter DA, Lea LJ, Dickens A, Briggs D, Pate I, Dearman RJ, Kimber I (1999). A comparison of statistical approaches to the derivation of EC3 values from local lymph node assay dose responses. *J. Appl. Toxicology*, 19, 261-266.
- (15) Basketter DA, Blaikie L, Derman RJ, Kimber I, Ryan CA, Gerberick GF, Harvey P, Evans P, White IR, and Rycroft RTG (2000). Use of local lymph node assay for the estimation of relative contact allergenic potency. *Contact Dermatitis*, 42, 344-348.

## 화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인(I)

· *In vitro* 3T3 NRU 광독성시험법

· 피부감작성시험 : 국소립프절시험법(LLNA)

발행년월일: 2007년 11월

발행인: 김명현

편집위원장: 문병우

편집위원: 김영찬, 김동섭, 최상숙, 박귀례,  
박승희, 손경훈, 이종권, 손경희,  
양성준, 김선미, 박성환, 박소라,  
김양희

발행처: 식품의약품안전청