

등록번호

안내서-0756-01

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

## - 피부감작성시험 -

*In Chemico* 펩타이드 반응을 이용한 피부감작성 시험법  
[Direct Peptide Reactivity Assay(DPRA)]

2016. 5.



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

독성평가연구부 특수독성과

# 지침서·안내서 제·개정 점검표

명칭

화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인(Ⅷ)(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(☞지침서) <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(☞안내서) <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</b> <b>확 인(부서장)</b>		<b>고 경 육</b> <b>이 종 권</b>

이 안내서는 화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인(VIII)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 2016년 5월 17일 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	B1-2016-4-001	2016.5.17	화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인(VIII) 제정
2	안내서-0756-01	-	「식약처 지침서등의 관리에 관한 규정」 개정에 따른 일괄 재분류 (규제개혁담당관실-3761호,2017.5.16)

## 목 차

I. 개요 .....	1
II. 유의사항 .....	2
III. 시험의 원칙 .....	4
IV. 시험절차 .....	5
V. 자료와 보고 .....	9
VI. 결과보고서 .....	12
VII. 용어정의 .....	15
VIII. 참고문헌 .....	18
부록 1. 시험법 숙련을 위한 시험물질 .....	21
부록 2. 분석 순서의 예 .....	23

## I. 개요

1. UN GHS(United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals)의 정의에 따르면 피부감작물질은 피부에 접촉하여 알레르기 반응을 일으키는 물질을 말한다<sup>(1)</sup>. 본 가이드라인은 UN GHS 기준에 따라 피부감작물질과 비감작물질을 구별하는 데 사용되는 *in chemico* 시험법(펩타이드 반응성 시험법, Direct Peptide Reactivity Assay, DPRA)을 설명한다<sup>(1)</sup>.
2. 피부감작에 관여하는 주요 생물학적 현상들이 알려져 있다. 피부감작과 관련된 화학적/생물학적 기전들에 대한 기존 지식들은 독성발현경로(Adverse Outcome Pathway, AOP)의 형식으로 요약하여 설명될 수 있다<sup>(2)</sup>. 독성발현경로는 피부감작의 시작 단계에서 중간 단계를 거쳐 유해효과, 즉 사람에서는 접촉성 피부염, 설치류에서는 접촉성 과민반응을 일으키는 과정으로 이루어진다. 피부감작 독성발현경로에 있어서의 분자 수준의 시작단계는 피부 단백질의 친핵성 중심에 친전자성 물질이 공유결합하는 것이다.
3. 피부감작성의 평가는 일반적으로 실험동물을 이용한다. 기니픽을 이용한 전통적인 방식인 Magnusson Kligman Guinea Pig Maximization Test(GMPT)와 Buehler Test - OECD TG 406<sup>(3)</sup>방법은 피부감작의 유도기와 유발기 모두 감안한 시험법이다. 설치류를 이용한 시험법인 Local Lymph Node Assay(LLNA, OECD TG 429<sup>(4)</sup>) 및 LLNA의 비방사성 변형법인 LLNA: DA(OECD TG 442A<sup>(5)</sup>)와 LLNA: BrdU-ELISA(OECD TG 442B<sup>(6)</sup>)방법들은 모두 유도기의 반응만을 반영한 시험법이다. 이 방법들은 동물복지 차원에서 기니픽 시험법보다 이점이 있고, 유도기의 피부감작능을 객관적으로 측정할 수 있기 때문에 피부감작성 시험법으로 인정되었다.
4. 최근에는 화합물질의 피부감작 유해성 평가에 있어서 메커니즘에 근거한 *in chemico*와 *in vitro* 시험법이 과학적으로 타당하다고 여겨지고 있다. 그러나 현재 사용 가능한 각각의 비동물 시험법들이 독성발현경로 메커니즘을 제한적으로 충족시키기 때문에, 현재 사용되고 있는 동물을 이용한 시험법을 완전히 대체하기 위해서는 비동물 시험법들(*in silico*, *in chemico*, *in vitro*)을 조합하는 통합독성평가(Integrated Approach to Testing and Assessment, IATA)가 필요하다<sup>(2)(7)</sup>.

5. DPRA는 피부감작 독성발현경로에서 분자적 초기현상, 즉 단백질의 반응성을 평가하는 것으로, 이는 시스테인 또는 리신을 함유한 합성 펩타이드 모델에 대한 시험물질의 반응성을 정량화한다<sup>(8)</sup>. 합성 펩타이드 내 시스테인과 리신 소실율은 피부감작성과 비감작성을 구별하기 위한 4가지 등급의 반응성으로 분류하는데 사용된다<sup>(9)</sup>.
6. DPRA는 화합물의 유해성 분류와 표시의 목적으로 피부감작성과 비감작성을 구별하기 위하여 통합독성평가의 일부로서 사용된다<sup>(10)</sup>. 또한 다른 정보와 조합할 목적으로 DPRA 데이터를 이용한다<sup>(11)(12)(13)(14)</sup>.
7. 본 가이드라인에서 사용된 용어의 정의는 VII 항에 기술되어 있다.

## II. 유의사항

1. 단백질 반응성과 피부감작성의 잠재력에 대한 상관관계는 잘 알려져 있다<sup>(15)(16)(17)</sup>. 그럼에도 불구하고 단백질 결합은 피부감작 독성발현경로의 분자적 초기단계로서 단지 하나의 주요한 단계(key event)에 지나지 않기 때문에 시험 또는 비시험 방법으로 생성된 단백질 반응성에 대한 정보만으로는 어떤 화합물이 피부감작성이 없다고 결론을 내리기 어렵다. 그러므로 본 가이드라인으로부터 얻어진 데이터는 다른 보완적인 정보들(예를 들어, 피부감작 독성발현경로의 다른 주요한 단계들을 대변할 수 있는 *in vitro* 시험법들과 유사한 화학물질과의 교차해석을 포함한 비시험법으로부터 유래된 정보들)과 조합하여 통합독성평가와 같은 통합적인 맥락에서 다뤄져야 한다.
2. 본 가이드라인에서 설명한 시험 방법은 다른 보완적인 정보들과 조합하여 통합독성평가 접근방식으로 피부감작성(UN GHS Category 1)과 비감작성을 구별하는 데 사용할 수 있다. 2개의 분류 기준으로 운영하는 국가의 경우, 본 가이드라인만으로 피부감작성을 UN GHS<sup>(1)</sup> Category 1A와 1B로 분류할 수 없으며, 또한 안전성 평가를 위한 예측에 사용될 수 없다. 그러나 규제에 따라 DPRA 양성 결과를 근거로 화학물질을 UN GHS Category 1로 분류할 수 있다.
3. DPRA는 액체크로마토그래프법(High-performance liquid chromatography, HPLC)을 운용하는 실험실에서 시행할 수 있다. 이 시험법은 실험실 내 재현성이 85%, 실험실 간 재현성이 80%로 알려져 있다<sup>(10)</sup>. 이 시험법의 검증연구<sup>(18)</sup>와 보고된 연구

결과<sup>(19)</sup>에 의하면, LLNA 결과를 기준하였을 때, 비감작으로부터 감작(UN GHS Category 1)을 구별해내는 정확도가 80%(N=157)이며, 80%의 민감도(88/109)와 77%의 특이도(37/48)를 갖는다. DPRA는 피부감작능이 낮거나 중간 수준을 나타내는 화학물질인 경우(UN GHS Category 1B) 피부감작능을 강하게 나타내는 화학물질(UN GHS Category 1A)에 비해 피부감작능이 실제보다 낮게 측정될 수 있다<sup>(18)(19)</sup>. 그러나 여기에서 제시된 독립적 시험법(Stand-alone)으로서 DPRA의 정확도 값은 단순한 지표일 뿐이다. 왜냐하면 이 시험법은 통합독성평가의 맥락에서 다른 시험법의 결과와 조합을 고려해야 하며, 위 II-2 항에 제시된 항목과도 일치되어야 하기 때문이다.

또한 피부감작평가를 위해 비동물 시험법을 활용할 때, LLNA 시험법뿐만 아니라 다른 동물 시험법도 인간의 상황을 완벽하게 반영하지 못함을 염두에 두어야 한다. 보고된 연구결과에 따르면 DPRA는 다양한 유기 작용기, 반응메카니즘, 피부감작능(*in vivo* 연구에서 결정된 바와 같이) 및 이화학적 성질을 가진 시험물질들에 적용할 수 있다<sup>(8)(9)(10)(19)</sup>. 이것은 DPRA가 피부감작 유해성을 판정하는데 유용하게 이용될 수 있다는 것을 의미한다.

4. 본 가이드라인에서 “시험물질”은 시험대상을 나타내며 이 용어는 화합물(substances) 또는 혼합물(mixtures)에 있어서 DPRA의 적용에 사용할 수 없다. 또한 금속 화합물은 공유결합이 아닌 다른 메커니즘으로 단백질들과 반응하는 것으로 알려져 있기 때문에 본 시험법을 적용할 수 없다. 시험물질은 적당한 용매에 녹여 최종농도가 100 mM이 되어야 한다(IV-3 항 참조). 그러나 이 농도에서 녹지 않는 시험물질인 경우 녹을 수 있는 낮은 농도에서 시험할 수 있다. 이 경우, 양성 결과는 피부감작으로 시험물질을 식별하는데 이용할 수 있지만 음성 결과로부터 반응성이 없다는 결론을 내릴 수 없다. 조성이 알려진 혼합물에 대한 DPRA의 사용도 제한적이다<sup>(18)(19)</sup>. 그럼에도 불구하고 DPRA는 다성분 물질과 구성이 알려진 혼합물의 시험에 기술적으로 적용할 수 있는 것으로 여겨진다(IV-3 항 참조). 이 시험법이 규제목적을 위해 혼합물의 피부감작능을 평가하는 경우, 이 시험법이 그 목적에 적합한지, 적합한 경우에는 시험법에 대한 적절한 이유는 무엇인지를 고려해야 한다. 이러한 고려사항은 이미 혼합물을 시험하는 규제요건이 있을 때는 필요하지 않다. 현재의 예측모델은 시험물질과 펩타이드 간의 몰 비율이 필요하기 때문에 조성이 알려져 있지 않은 혼합물과 조성이 알려져 있지 않거나 다양한 조성을 가진 화합물, 복잡한 반응산물 및 생물학적 물질(UVCB)에는 사용할 수 없다. 이와 같은 물질들은 중량을 기반으로 하는 새로운 예측모델을 만들어야



한다. 기타 특정한 범주의 화합물에 대하여 본 가이드라인을 적용할 수 없다는 사례가 있는 경우 특정 화합물에 이 시험법을 사용하지 말아야 한다.

5. 본 가이드라인은 *in chemico* 방법으로, 대사시스템을 전체적으로 총망라하는 것은 아니다. 피부감작성을 나타내기 위하여 효소에 의한 활성화 단계를 거쳐야 하는 화학물질(*pro-haptens*)들은 이 시험법으로 측정할 수 없다. 비생물학적 변형을 거쳐 피부감작성을 나타내는 화학물질(*pre-haptens*)은 일부의 경우에 이 시험법으로 정확하게 측정할 수 있다고 보고된다<sup>(18)</sup>. 위에서 언급한 바와 같이 이 시험법에서 얻어진 음성 결과는 설명되었던 시험법의 한계와 통합독성평가의 맥락에서 다른 시험법의 정보와 연관되어 해석되어야 한다. 펩타이드에 공유결합을 하지 않지만 펩타이드의 산화를 촉진하는(예, 시스테인 이합체화) 시험물질인 경우 펩타이드 소실이 실제보다 과대평가될 수 있고, 그 결과 시험물질은 위양성으로 예측되거나 높은 반응성을 나타내는 그룹으로 분류될 가능성이 있다(V-3 항 참조).
6. 위에서 설명한 바와 같이, DPRA는 피부감작성과 비감작성을 구분하는데 사용될 수 있다. 또한 통합독성평가와 같은 통합적 접근법에 사용되어질 때 피부감작성 (*sensitising potency*)<sup>(11)</sup>을 평가하는데 기여하게 될 것이다. 그러나 DPRA 결과가 어떻게 피부감작성을 평가하는데 관련되는 지를 파악하기 위해서는 더 많은 연구(특히, 인체 데이터에 바탕을 둔 연구)가 요구된다.

### III. 시험법의 원칙

1. DPRA는 25 ± 2.5°C에서 시험물질을 24 시간 반응시킨 다음 시스테인 또는 리신 함유 펩타이드 농도를 정량하는 *in chemico* 방법이다. 이 합성펩타이드들은 검출을 돕기 위해 페닐알라닌을 함유한다. 펩타이드 농도는 HPLC에서 구배용출(*gradient elution*)로 220 nm에서 흡광도를 측정하여 결정된다. 시스테인 또는 리신 펩타이드의 소실율이 산출되고, 예측모델에 사용된다(V-3 항, 표 1 참조). 이 예측모델에서 시험물질은 감작성인지 혹은 비감작성인지 구별하기 위한 4개의 반응성 분류 중 하나에 해당하게 된다.
2. 본 가이드라인에서 설명한 방법을 일상적으로 사용하기 전에 실험실은 부록 1에 수록된 10개의 숙련도 시험물질을 이용하여 기술적 숙련도를 입증하여야 한다.

## IV. 시험절차

1. 본 가이드라인은 DPRA DB-ALM 프로토콜 n° 154<sup>(20)</sup>에 바탕을 두고 있다. 다음은 DPRA의 주요 구성과 방법들에 대하여 설명이다. 만약 적용하고자하는 HPLC 분석방법이 DB-ALM 프로토콜에 설명하고 있는 검증된 아세토니트릴 분석방법과 다르다면 그 방법이 동등하다는 것을 증명하여야 한다.(예, 부록 1의 시험물질을 이용한 숙련도 검사).

2. 시스테인- 또는 리신-함유 펩타이드의 제조

○ 순도가 85% 이상(되도록 90-95%의 범위)의 시스테인(Ac-RFAACAA-COOH) 또는 리신(Ac-RFAAKAA-COOH) 함유 합성 펩타이드의 용액은 시험물질과 반응시키기 직전 조제한다. 시스테인 펩타이드의 최종 농도는 pH 7.5의 인산 완충액에서 0.667 mM이며 리신 펩타이드의 최종 농도는 pH 10.2의 암모늄아세테이트 완충액에서 0.667 mM이어야 한다. 한 번의 아세토니트릴 분석시간은 30시간 이내가 되도록 조정한다. 본 가이드라인의 아세토니트릴 분석으로 최대 26개의 분석시료(이것은 시험물질, 양성대조군, 시험에 사용된 각각의 용매 수에 근거한 용매대조군이며, 각각 3회 반복씩 감안한 것임)가 한 번의 분석배치에서 처리될 수 있다. 동일한 아세토니트릴 분석배치에 사용하는 모든 샘플시료는 동일한 시스테인 또는 리신 펩타이드 용액을 사용하여야 한다. 이 용액을 사용하기 전, 각 펩타이드 배치의 용해도가 적절하다는 것을 증명하여야 한다.

3. 시험물질의 제조

○ 분석하기 전 DPRA DB-ALM 프로토콜<sup>(20)</sup>에 따라서 적절한 용매에 시험물질의 용해도를 측정해야 한다. 그리고 적절한 용매는 시험물질을 완전히 녹여야 한다. DPRA에 있어서 시험물질을 과량의 시스테인 또는 리신 펩타이드와 반응시키기 때문에 맑은 용액 형성여부를 육안으로 관찰하는 것은 시험물질(다성분으로 이루어진 화합물 또는 혼합물을 시험하는 경우에 있어서 모든 구성 성분들)이 용해되었는지를 확인하는 충분한 방법이다. 이 시험법에 있어서는 아세토니트릴(acetonitrile), 물, 물과 아세토니트릴이 1:1 비율로 섞인 용액, 이소프로판올(isopropanol), 아세톤(acetone), 아세톤과 아세토니트릴이 1:1 비율로 섞인 용액들이 적당한 용매로 사용된다.

참고대조군 C(적당한 용매에 용해된 펩타이드만으로 구성된 시료들; 부록 2 참조)로 확인하였을 때 펩타이드의 안정성에 영향을 주지 않는다면 다른 용매도 사용 가능하다. 만일 시험물질이 이들 용매 중 어느 것에서도 녹지 않는다면 마지막 선택으로 시험물질을 디메틸설폭사이드(DMSO) 300  $\mu$ L에 녹인 다음 아세토니트릴 2700  $\mu$ L을 넣어 희석하는 방법이 있다. 여기에도 녹지 않으면 DMSO 1500  $\mu$ L에 녹인 다음 아세토니트릴 1500  $\mu$ L을 넣어 희석한다. 시험물질을 유리 바이알(vial)에서 미리 무게를 재고 시험 직전에 적당한 용매에 녹여 100 mM 용액을 만든다.

- 혼합물이나 조성이 알려지고 다성분으로 이루어진 화합물인 경우, 그 물질의 순도는 그 구성성분들(물 제외) 비율의 합으로 결정되어야 하며, 그 분자량은 혼합물(물 제외)인 경우 구성성분 각각의 분자량 및 비율을 고려하여 결정되어야 한다. 계산된 순도 및 분자량은 100 mM 용액을 준비하기 위해 필요한 시험물질의 무게를 계산하는데 사용된다. 주요 구성성분의 분자량을 결정할 수 없는 중합체는 단량체의 분자량(또는 중합체를 이루는 다양한 단량체들의 분자량)으로 100 mM 용액을 준비할 수 있다.
- 그러나 조성이 알려진 중합체, 다성분으로 이루어진 화합물, 혼합물을 시험하는 경우, 원 화학물질(neat chemical)의 평가를 고려해야 한다. 액체인 경우, 용매에 희석과정 없이 시스테인 또는 리신 펩타이드와 각각 1:10 또는 1:50으로 혼합하여 반응시킨 원 화학물질이 평가되어야 한다. 고체인 경우 시험물질은 100 mM 용액을 만들 때 사용하는 같은 용매에 최대한 녹일 수 있는 농도만큼 녹인다. 이 용액을 더 이상의 희석 과정 없이 시스테인 또는 리신 펩타이드와 각각 1:10 또는 1:50으로 혼합하여 반응시킨다. 100 mM 용액과 원 화학물질의 결과 값이 같다면, 시험하여 얻어진 결과에 대해 확신할 수 있다.

#### 4. 양성대조군, 참고대조군, 동시용출(Co-elution)대조군의 제조

- 아세토니트릴에 100 mM 농도로 녹인 cinnamic aldehyde(CAS 104-55-2;  $\geq$  95% 식용기준의 순도)를 양성대조군으로 한다. 만일 허용기준을 충족하는 데이터가 있다면 되도록 중간 범위의 소실 값을 갖는 다른 적당한 양성대조군을 이용할 수 있다. 추가적으로 참고대조군들(적당한 용매에 펩타이드만 녹인 시료)을 HPLC 분석에 포함시켜야 한다. 이러한 참고대조군들은 HPLC 시스템의 적합성을 증명하기 위한 참고대조군 A, 시간 경과에 따른 안정성을 증명하기

위한 참고대조군 B, 시험물질을 녹인 용매가 펩타이드 소실율에 영향을 주지 않는다는 것을 증명하기 위한 참고대조군 C가 있으며(부록 2 참조), 각 물질에 대한 적절한 참고대조군들은 그 물질에 대한 펩타이드 소실율을 계산하기 위하여 이용된다(V-1 항 참조). 또한 시험물질의 머무름시간(retention time)이 시스테인이나 리신 펩타이드의 머무름시간이 같은 지를 확인하기 위하여 각 시험물질로만 구성된 동시용출 대조군을 HPLC 분석에 포함해야 한다.

## 5. 시험물질과 시스테인 또는 리신 펩타이드 용액의 반응

- 유리 재질의 자동시료주입 바이알에서 시험물질과 시스테인 또는 리신 펩타이드 용액을 각각 1:10 또는 1:50의 비율로 반응시킨다. 시험물질의 낮은 수용성 때문에 시험물질을 펩타이드 용액에 첨가하고 나서 즉시 침전물이 관찰되는 경우, 펩타이드와 반응할 수 있는 시험물질이 용액 중 얼마만큼 남아있는지 알 수 없다. 이 경우, 양성 결과는 이용할 수 있으나 음성 결과는 불확실하기 때문에 조심스럽게 해석해야 한다(100 mM 농도에서 녹지 않는 화합물에 대한 II-4 항의 설명 참조). 반응용액은  $25 \pm 2.5$  °C의 암실에서  $24 \pm 2$ 시간 동안 반응시킨 후 HPLC로 분석한다. 시험물질은 두 펩타이드에 대하여 각각 3회 반복하여 분석한다. 검체는 HPLC로 분석하기 전에 육안으로 검사하여야 한다. 만약 침전물이나 상의 분리가 발견되면 그 침전물들을 가라앉히기 위해 원심분리한다. 과량의 침전물은 액체크로마토그래피의 관이나 칼럼을 막을 수 있기 때문에 검체를 낮은 속도( $100 \sim 400 \times g$ )로 원심분리하여 침전물을 바이알의 바닥으로 침전시킨다. 반응 후에 침전물이나 상의 분리가 일어나면 펩타이드 소실이 과소평가 될 수 있고, 음성 결과의 경우에도 반응이 없다는 결론은 내릴 수 없다.

## 6. HPLC 표준검량곡선 작성

- 시스테인과 리신 펩타이드 모두에 대한 표준검량곡선을 작성하여야 한다. 펩타이드 표준액은 20% 또는 25%의 아세트니트릴:완충액을 사용하여 준비한다. 완충액은 시스테인 펩타이드인 경우 인산 완충액(pH 7.5)을, 리신 펩타이드인 경우는 암모늄아세테이트 완충액(pH 10.2)을 사용한다. 펩타이드 원액(0.667mM)을 순차적으로 희석하여 0.534-0.0167 mM 범위의 6개 표준액을 제조한다. 희석 완충액의 맹검액(blank)도 표준검량곡선에 포함시켜야 하며, 적절한 표준검량곡선의  $r^2$  값은 0.99를 초과하여야 한다.

## 7. HPLC 준비와 분석

○ HPLC 분석을 수행하기 전 HPLC 시스템의 적합성을 증명하여야 한다. 펩타이드 소실은 UV 검출기(광다이오드 배열 검출기 또는 220 nm에서 고정 파장 흡광도 검출기)를 장착한 HPLC로 분석하여 정량화할 수 있다. 적당한 칼럼을 HPLC 시스템에 장착한다. 검증 프로토콜에 있어서 HPLC 분석은 Zorbax SB-C-18 (2.1 mm x 100 mm x 3.5  $\mu$ m) 칼럼을 사용하였다. 이 역상 HPLC 칼럼을 포함한 전체 시스템은 샘플을 분석하기 전에 30 °C에서 50%의 이동상 A (0.1% (v/v) trifluoroacetic acid in water)와 50%의 이동상 B (0.085% (v/v) trifluoroacetic acid in acetonitrile)로 최소 2시간 동안 흘려주어 평형을 이루도록 한다. HPLC 분석은 0.35 mL/분의 유속으로 10분 동안 아세토니트릴을 10%에서 25%까지 직선 구배로 증가시키고, 이후 아세토니트릴 농도를 90%까지 급속하게 증가시켜 다른 물질들을 제거한다. 동일한 부피의 표준물질, 검체, 대조군을 주입한다. 칼럼은 주입 사이에 7분 동안 초기 조건에서 재평형시킨다. 만약 다른 종류의 역상 HPLC 칼럼을 사용하는 경우, 주입량(사용된 시스템에 따라 달라질 수 있으나, 일반적으로 3-10  $\mu$ L 범위임)을 포함한 조작조건을 적절히 조정하여 시스테인 또는 리신 펩타이드가 적절하게 용리되어 그 피크면적이 계산될 수 있도록 한다. 무엇보다도 중요한 것은, 만약 다른 HPLC 분석조건을 이용한다면 위에서 설명한 검증된 HPLC 분석조건과 동등하다는 것을 증명하여야 한다(예, 부록 1의 숙련도 시험). 흡광도는 220 nm에서 측정하며, 만약 광다이오드 배열 검출기를 이용한다면 258 nm에서의 흡광도를 측정한다. 어떤 아세토니트릴 제품은 펩타이드 안정성을 떨어뜨릴 수 있기 때문에 주의해야 하며 새로운 배치의 아세토니트릴을 사용할 때 펩타이드의 안정성에 대해 평가하여야 한다. 220 nm과 258 nm에서 피크면적 비는 동시 용출을 확인하는 지표로 사용될 수 있다. 각 시료의 피크면적 비가 대조군 시료 피크면적 비의 평균제곱값 (mean<sup>2</sup>)의 90%~ 100% 범위에 있다면 동시에 용출되지 않았다는 좋은 증거이다.

○ 시스테인 펩타이드의 산화를 촉진하는 시험물질이 있을 수 있다. 이합체 시스테인 펩타이드의 피크는 육안으로 확인할 수 있다. 만약 이합체화가 일어나면 펩타이드 소실율이 과대평가되어 위양성으로 판정되거나 더 높은 반응성 등급으로 판정받는 결과를 초래할 수 있다는 점을(위양성 판정 및/또는 더 높은 반응성 등급으로 분류될 수 있기 때문에) 주의해야 한다(V-3 항 참조).

- 시스테인과 리신 펩타이드의 HPLC 분석은 동시에 수행하거나(만약, 두 대의 HPLC 시스템을 갖추고 있다면) 각각 다른 날에 수행할 수 있다. 만약 분석을 다른 날에 한다면 모든 시험물질 용액은 시험 당일 분석을 위해 새롭게 조제하여야 한다. 분석 시간은 첫 시료의 주입 시간이 시험물질과 펩타이드 용액을 혼합한 후, 22 - 26시간에 시작될 수 있도록 조정해야 하며, HPLC 분석시간은 30시간 이내에 마칠 수 있도록 조정해야 한다. 검증연구와 본 가이드라인에서 사용한 HPLC 분석조건은 한 대의 HPLC를 이용하는 경우 한번에 26개 샘플까지 처리할 수 있다(IV-2 항 참조). HPLC 분석 순서의 예는 부록 2에 수록하였다.

## V. 자료와 보고

### 1. 데이터 판정

- 시스테인 또는 리신 펩타이드의 농도는 각 검체를 220 nm의 파장에서 광도계로 측정하여 적당한 피크의 면적(곡선하면적, area under the curve: AUC)을 측정한 후, 표준액으로부터 얻어진 표준검량곡선에 대입하여 계산할 수 있다.
- 펩타이드 소실율은 각 검체에서 피크면적을 구하고 이것을 참고대조군 C의 평균 피크면적으로 나눈 값으로 결정한다(부록 2 참조). 구하는 식은 다음과 같다.

$$\text{펩티드소실 백분율} = \left[ 1 - \left( \frac{\text{검체의 펩티드 피크면적}}{\text{참고대조군 C의 펩티드 피크면적 평균}} \right) \right] \times 100$$

### 2. 허용기준

- HPLC 분석의 유효성을 얻기 위해서 다음의 기준을 충족시켜야 한다: a) 표준검량곡선에서  $r^2 > 0.99$ 이어야 한다, b) 양성대조군 cinnamic aldehyde의 3회 반복 펩타이드 평균 소실율은 시스테인 펩타이드인 경우 60.8-100% 범위의 값, 리신 펩타이드인 경우는 40.2-69% 범위의 값을 나타내야 하며,

양성대조군 반복 시료들의 최대 표준편차가 시스템인 소실율에서는 14.9% 이하, 리신 소실율에서는 11.6% 이하로 나타나야 한다. c) 참고대조군 A의 펩타이드 농도 평균이  $0.50 \pm 0.05$  mM이어야 하고, 9개의 참고대조군 B와 C의 펩타이드 피크의 변동계수(coefficient of variation: CV)는 15.0% 이하이어야 한다. 만약 이 기준 중 하나라도 충족시키지 못하면 HPLC 분석은 다시 실시하여야 한다.

- 시험물질의 결과가 유효성이 있기 위해서는 다음의 기준을 충족시켜야 한다:
  - a) 시험물질 반복 시료들의 최대 표준편차는 시스템인 소실율에서는 14.9% 이하, 리신 소실율에서는 11.6% 이하이어야 하며, b) 적당한 용매에서 3 개의 참고대조군 C의 펩타이드 농도 평균은  $0.50 \pm 0.05$  mM이어야 한다. 만약 이 기준들을 충족시키지 못하면 데이터는 기각하고 그 시험물질에 대한 HPLC 분석을 다시 수행하여야 한다.

### 3. 예측모델

- 각각의 시험물질에 대하여 시스템인 소실과 리신 소실의 평균값을 구한다. 평균 소실값을 계산했을 때, 음수이면 “0”으로 간주한다. 표 1에서 제시된 시스템인 1:10/리신 1:50 예측모델을 사용함에 있어서, 기준점 6.38%의 평균 펩타이드 소실에 대한 역치는 통합독성평가 맥락에서 피부감작 물질과 비감작 물질을 구별하기 위해 사용된다. (즉, 시험물질의 반응 등급을 결정하기 위한 예측모델은 통합독성평가 맥락에서 감작능을 평가하는데 유용하다.)

**표 1: 시스템인 1:10/리신 1:50 예측모델<sup>1</sup>**

시스템인과 리신 소실 % 평균	반응성 등급	DPRA 예측 <sup>2</sup>
$0\% \leq \text{소실 \% 평균} \leq 6.38\%$	무반응성 또는 최소반응성	음성
$6.38\% < \text{소실 \% 평균} \leq 22.62\%$	저반응성	양성
$22.62\% < \text{소실 \% 평균} \leq 42.47\%$	중반응성	
$42.47\% < \text{소실 \% 평균} \leq 100\%$	고반응성	

<sup>1</sup>숫자는 통계적으로 생성된 기준값이며 측정의 정밀도와 관련이 없다.

<sup>2</sup>DPRA 예측은 통합독성평가 틀 안에서 고려해야 하며 II-2, II-5 항의 조건을 따른다.

- 어떤 시험물질(단일 화합물, 단일 또는 여러 가지 성분들로 구성된 다성분

화합물, 또는 혼합물)이 220 nm에서 상당한 흡광도를 나타내고 펩타이드와 동일한 머무름시간을 보일 수 있다(동시 용출). 이러한 동시 용출은 시험물질과 펩타이드의 용출시간을 분리하기 위하여 HPLC 분석조건을 약간 조정함으로써 해소할 수 있다. 만약 동시 용출을 해소하기 위하여 다른 HPLC 분석조건을 사용한다면 검증된 분석조건과 동등하다는 것을 증명하여야 한다(예, 부록 1의 숙련도 시험). 만약 동시 용출이 일어나면 펩타이드 피크의 면적을 구할 수 없고 펩타이드 소실율도 계산할 수 없다. 시스테인과 리신 펩타이드에서 모두 동시 용출되는 경우 분석결과는 “미결”로 보고한다. 리신 펩타이드에서만 동시 용출이 일어나면 표 2에서와 같이 시스테인 1:10 예측모델을 이용할 수 있다.

**표 2: 시스테인 1:10 예측모델<sup>1</sup>**

시스테인 소실 %	반응성 등급	DPRA 예측 <sup>2</sup>
$0\% \leq \text{시스테인 소실 \%} \leq 13.89\%$	무반응성 또는 최소반응성	음성
$13.89\% < \text{시스테인 소실 \%} \leq 23.09\%$	저반응성	양성
$23.09\% < \text{시스테인 소실 \%} \leq 98.24\%$	중반응성	
$98.24\% < \text{시스테인 소실 \%} \leq 100\%$	고반응성	

<sup>1</sup>숫자는 통계적으로 생성된 기준값이며 측정의 정밀도와 관련이 없다.

<sup>2</sup>DPRA 예측은 통합독성평가 틀 안에서 고려해야 하며 II-2, II-5 항의 조건을 따른다.

- 시험물질과 두 개의 펩타이드 중 하나가 겹치는 현상이 불완전한 경우도 있을 수 있다. 이 경우 펩타이드 소실율은 시스테인 1:10, 리신 1:50 예측모델을 이용하여 추정될 수 있지만, 시험물질의 반응성 등급은 정확히 분류할 수 없다.
- 시험결과가 명백하다면 시스테인과 리신 펩타이드에 대한 한 번의 HPLC 분석으로 충분하다. 그러나 결과가 양성과 음성을 구분하는 기준점에 가까이 있을 때에는(즉, 경계 결과) 추가적인 시험이 필요하다. 만약 시스테인 1:10/리신 1:50 예측모델에서 소실율 평균이 3-10% 범위이거나 시스테인 1:10 예측모델에서 시스테인 소실율이 9-17% 범위에 있다면 2차 시험을 고려해야 한다. 또한, 두 번의 시험에서 서로 불일치한 결과가 나오면 3차 시험을 고려해야 한다.



## VI. 결과보고서

○ 결과보고서는 다음의 정보를 포함하여야 한다.

○ 시험물질

● 단일성분 화합물

- IUPAC 또는 CAS 명칭, CAS 번호, SMILES 또는 InChI 코드, 구조식 및/또는 다른 식별요인 등과 같은 화학적 특징
- 물리적 성상, 용해도, 분자량, 기타 물리화학적 성질
- 순도, 불순물의 종류
- 시험 전 처리방법(예, 가온, 분쇄)
- 시험 농도
- 보관 조건과 안정성

● 다성분 화합물, UVCB, 혼합물

- 특징 : 성분들의 화학적 특징, 순도, 함량, 물리화학적 성질
- 물리적 성상, 용해도, 기타 물리화학적 성질
- 분자량, 또는 겉보기 분자량(조성이 알려지거나 다른 관련 정보들이 알려진 혼합물/중합체의 경우)
- 시험 전 처리방법(예, 가온, 분쇄)
- 시험 농도
- 보관 조건과 안정성

○ 대조군

● 양성대조군

- IUPAC 또는 CAS 명칭, CAS 번호, SMILES 또는 InChI 코드, 구조식
- 물리적 성상, 용해도, 분자량, 기타 물리화학적 성질
- 순도, 불순물의 종류
- 시험 전 처리방법(예, 가온, 분쇄)
- 시험 농도
- 보관 조건과 안정성
- 가능하다면, 판정 기준의 적합성을 설명할 만한 양성대조군 결과에 대한 참고문헌

- 용매/부형제
  - 사용된 용매/부형제 및 그 성분들의 비율
  - IUPAC 또는 CAS 명칭, CAS 번호 등과 같은 화학적 특징
  - 순도, 불순물의 종류
  - 가이드라인에서 제시되지 않은 용매/부형제를 사용하였을 경우 이들의 물리적 성상, 분자량, 기타 물리화학적 성질
  - 보관 조건과 안정성
  - 용매 선택의 근거(각각의 시험물질에 대한 용매 선정의 근거)
  - 아세토니트릴의 경우, 펩타이드 안정성에 미치는 영향에 대한 시험 결과
  
- 펩타이드, 양성대조군, 시험물질의 제조
  - 펩타이드 용액의 특징(공급자, 로트, 펩타이드의 정확한 무게, stock 용액에 첨가된 양)
  - 양성대조군의 용액의 특징(양성대조군 물질의 정확한 무게, 시험용액에 첨가된 양)
  - 시험물질 용액의 특징(시험물질의 정확한 무게, 시험용액에 첨가된 양)
  
- HPLC 기기 및 분석조건
  - HPLC 기기 및 칼럼, 가드 칼럼, 검출기 및 자동시료주입기의 종류
  - HPLC 분석과 관련한 지표 : 칼럼 온도, 주입량, 유속, 구배
  
- 시스템 적합성
  - 표준물질과 참고대조군 A 시료의 220 nm에서 펩타이드 피크면적
  - 직선 표준검량곡선을 그림으로 제시하고  $r^2$  표시
  - 각각의 참고대조군 A의 펩타이드 농도
  - 3 개의 참고대조군 A 시료의 펩타이드 농도(의) 평균(mM), 표준편차, 변동계수
  - 참고대조군 A와 C의 펩타이드 농도
  
- 분석 순서
  - 참고대조군
    - 참고대조군 B와 C의 220 nm에서 펩타이드 피크면적
    - 아세토니트릴에 녹인 9 개의 참고대조군 B와 C의 펩타이드 피크면적 평균, 표준편차, 변동계수(분석기간 동안 안정성 확인을 위한 참고대조군)
    - 각각의 사용한 용매에 대해서는 3 개의 참고대조군 C의 220 nm에서

펩타이드 피크면적 평균(펩타이드 소실을 계산 목적)

- 사용한 용매별 3 개의 적당한 참고대조군 C의 펩타이드 농도(mM)
- 사용한 용매별 3 개의 적당한 참고대조군 C의 펩타이드 농도(mM) 평균, 표준편차, 변동계수

● 양성대조군

- 각 양성대조군 시료의 220 nm에서 펩타이드 피크면적
- 각 양성대조군 시료의 펩타이드 소실율
- 3 개의 양성대조군 시료의 펩타이드 소실율 평균, 표준편차, 변동계수

● 각각의 시험물질

- 반응 후 반응액에서 침전물의 형성 여부. 침전물의 재용해 또는 원심분리 여부
- 동시용출 여부
- 기타 특이사항의 설명
- 각 시험물질의 220 nm에서 펩타이드 피크면적
- 각 시험물질의 펩타이드 소실율
- 3개의 시험물질의 펩타이드 소실율 평균, 표준편차, 변동계수
- 시스테인과 리신 소실율의 평균
- 사용된 예측모델과 DPRA 예측

○ 숙련도 시험

- 해당되는 경우, 실험실에서 시험법의 숙련도시험 과정(예, 숙련도를 위한 시험물질을 이용) 또는 시험법의 재현성 확보과정 제시

○ 고찰

- DPRA 시험결과의 고찰
- 다른 관련 있는 정보가 있다면(기타 관련 정보가 있는 경우) 통합독성평가의 맥락에서 본 시험법 결과의 고찰

○ 결론

## VII. 용어정의

1. **정확도(Accuracy)** : 시험결과와 참고치의 일치 정도. 시험 수행에 대한 평가 척도이고 상관성(relevance)의 한 측면이다. 정확하게 맞춘 시험결과의 비율을 의미하는 “일치성(concordance)"과 "정확도(Accuracy)"는 같은 의미로 쓰임<sup>(21)</sup>
2. **독성발현경로(AOP, Adverse Outcome Pathway)** : 분자 수준의 시작단계를 거쳐서 in vivo 유해반응까지 표적 화합물 또는 유사한 화합물 그룹으로부터 일어나는 일련의 사건<sup>(2)</sup>
3. **표준검량곡선(Calibration curve, standard curve)** : 알려진 물질의 분석 농도와 시험 반응 값과의 관계
4. **변동계수(Coefficient of variation)** : 동일 반복시료로부터 얻은 데이터의 변동성을 나타내며 표준편차를 평균으로 나눈 값. 100을 곱하여 백분율로 나타냄
5. **유해성(Hazard)** : 물질이 생명체, 생태계 또는 특정 인구집단에 노출될 때, 유해영향을 야기할 가능성이 있는 물질 또는 상황(situation)의 본질적 특성
6. **통합독성 평가(IATA, Integrated Approach to Testing and Assessment)** : 화학물질 또는 화학 그룹의 유해성 동정(잠재력), 유해성 특성(효력) 및/또는 안전성 평가(잠재력/효력, 노출)를 위하여 사용되는 구조적 접근 방법. 유해성 잠재력 및/또는 위험성 및/또는 심화 추적 필요성에 관한 규제결정을 위하여 모든 관련 데이터를 전략적으로 통합하고 경중을 가림으로써 최소한의 시험만 수행하도록 함
7. **분자적 초기 현상(Molecular Initiating Event)** : 독성발현경로의 시작단계로서 분자 수준에서 화학물질에 의해 유도되는 생물계의 변화
8. **혼합물(Mixture)** : 서로 반응하지 않는 두 가지 이상의 화학물질로 구성된 혼합물질 또는 용액<sup>(1)</sup>
9. **단일성분 화합물(Mono-constituent substance)** : 정량적인 구성에 의해 정의되어지며, 하나의 주요성분이 적어도 80% (w/w)이상인 물질

10. **다성분 화합물(Multi-constituent substance)** : 두 가지 이상의 주요성분의 양이  $\geq 10\%$  (w/w) 및  $< 80\%$  (w/w)인 물질. 다성분 물질은 생산과정의 산물이다. 혼합물과 다성분 물질의 차이는 혼합물은 두 가지 이상의 물질을 화학반응 없이 섞어서 얻고, 다성분 물질은 화학반응의 산물임
11. **양성대조군(Positive control)** : 시험계의 모든 구성요소를 포함하고 양성반응을 유도한다고 알려진 물질을 처리한 군. 시간에 따른 양성대조군 반응의 변동성을 평가할 수 있다는 확신을 갖기 위하여 양성반응의 범위가 초과해서는 안 됨
12. **참고대조군(Reference control)** : 한 시험계의 모든 구성요소를 포함하면서 아무런 처리를 하지 않는 시험물질. 시험물질을 처리하기 위해 사용된 용매 또는 부형제 및 동일한 용매 또는 부형제로 녹인 시험물질로 처리한 시료의 기본반응(baseline response)을 정하기 위해 사용된 다른 대조군 샘플. 음성대조군과 함께 시험될 때, 참고대조군은 용매 또는 부형제가 시험계와 상호작용하는 지 보여줌
13. **상관성(Relevance)** : 시험과 관심효과의 관련성 및 시험이 특정 목적에 의미 있고 유용한 지에 대한 설명. 상관성은 시험이 얼마나 관심 생물학적 효과를 정확하게 측정하고 예측하는 지 나타내며, 상관성은 시험법의 정확도(일치성)를 내포함<sup>(21)</sup>
14. **신뢰도(Reliability)** : 동일한 시험방법에 따라 반복 시행하였을 때 동일 실험실과 다른 실험실에서 시험 결과를 재현할 수 있는 정도. 신뢰도는 실험실 내, 실험실 간 재현성(reproducibility)으로 평가됨<sup>(21)</sup>.
15. **재현성(Reproducibility)** : 동일한 방법으로 동일한 물질을 시험하였을 때 나온 결과의 일치(신뢰도 참조)<sup>(21)</sup>
16. **민감도(Sensitivity)** : 시험법으로 모든 양성/활성 물질이 정확하게 분류되는 비율. 민감도는 시험법의 범주 결정에 대한 정확도의 척도이며 시험법의 상관성을 평가하는 중요한 고려사항임<sup>(21)</sup>
17. **특이도(Specificity)** : 시험법으로 모든 음성/비활성 물질이 정확하게 분류되는

비율. 특이도는 시험법의 범주 결정에 대한 정확도의 척도이며 시험법의 상관성을 평가하는 중요한 고려사항임<sup>(21)</sup>

18. **화합물(Substance)** : 생산과정을 통해 얻어지거나 또는 자연상태로 얻어진 화학원소들(elements)과 이들로 이루어진 구성물질(compound). 생산품의 안정성을 유지시키는데 필요한 첨가제와 생산과정에서 유래하는 불순물을 포함한다. 그러나 해당물질의 안정성이나 조성의 변화에 영향을 주지 않고 분리될 수 있는 용매는 제외함<sup>(1)</sup>

19. **시스템 적합성(System suitability)** : 분석 배치를 운전하기 전에 표준물질을 분석하여 기기 성능(예, 민감도)을 판정<sup>(22)</sup>

20. **시험물질(Test chemical)** : 시험할 때 무엇을 사용하였는지 언급할 때 사용됨

21. **UN GHS (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals)** : 물리적, 보건적, 환경적 유해성의 수준 및 표준화된 유형에 따른 화학물질(물질 또는 복합화합물)의 분류체계로, pictogram, 표시방법, 유해 사항, 사전 주의사항, 안전정보지 등의 소통 방식을 통해 화학물질의 유해 정보를 전달하여, 사람(고용주, 근로자, 운송자, 소비자, 응급처치자 등)과 환경을 보호하고자 제시된 체계<sup>(1)</sup>

22. **UVCB (Substances of unknown or variable composition, complex reaction products or biological materials)** : 조성이 알려져 있지 않거나 다양한 조성으로 이루어진 화합물, 복잡한 반응산물, 또는 생물학적 물질

23. **검증된 시험법(Validated test method)** : 특정한 목적에 대한 상관성과 신뢰도를 충족시키고 과학적으로 입증된 원리에 근거한 시험법. 절대적으로 완벽하게 검증된 시험법은 없지만 특정한 목적과 관련됨<sup>(21)</sup>

## VIII. 참고문헌

1. United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2013. Available at:  
[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev05/05files\\_e.html](http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html)
2. OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168, OECD, Paris.
3. OECD (1992). Skin Sensitisation. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 406, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
4. OECD (2010), The Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 429, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at :  
<http://www.oecd.org/env/testguidelines>
5. OECD (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay: DA. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442A, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at:  
<http://www.oecd.org/env/testguidelines>
6. OECD (2010), Skin Sensitisation: BrdU-ELISA: DA. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442B, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at:  
<http://www.oecd.org/env/testguidelines>
7. Adler *et al.* (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. Archives of Toxicology 85:367-485.

8. Gerberick *et al.* (2004). Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. *Toxicological Sciences* 81:332-343.
9. Gerberick *et al.* (2007). Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: A classification tree model approach. *Toxicological Sciences* 97:417-427.
10. EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) for skin sensitisation testing. Available at: [http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our\\_labs/eurl-ecvam/eurlecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay/dpra](http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurlecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay/dpra).
11. Jaworska *et al.* (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice *Journal of Applied Toxicology*, published online, 14 May 2013, DOI: 10.1002/jat.2869.
12. Bauch *et al.* (2012). Putting the parts together: combining in vitro methods to test for skin sensitizing potential. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 63: 489-504.
13. Nukada *et al.* (2013). Data integration of non-animal tests for the development of a test battery to predict the skin sensitizing potential and potency of chemicals. *Toxicology In Vitro* 27:609-618.
14. Ball *et al.* (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and in vitro methods in a weight-of evidence approach. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 60:389-400.
15. Landsteiner and Jacobs (1936). Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. *Journal of Experimental Medicine* 64:625-639.
16. Dupuis and Benezra (1982). Allergic contact dermatitis to simple



chemicals: a molecular approach. New York & Basel: Marcel Dekker Inc.

17. Lepoittevin *et al.* (1998). Allergic contact dermatitis: the molecular basis. Springer, Berlin.
18. EC EURL ECVAM (2012). Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) Validation Study Report 74pp. Accessible at :  
[http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our\\_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvamrecommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra](http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvamrecommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra)
19. Natsch *et al.* (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. Journal of Applied Toxicology, published online, 9 April 2013, DOI:10.1002/jat.2868.
20. DB-ALM (INVITTOX) Protocol 154: Direct Peptide Reactivity assay (DPRA) for skin sensitisation testing 17pp. Accessible at:  
<http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>
21. OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment, No. 34. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
22. FDA (Food and Drug Administration (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation 22pp. Accessible at:  
[www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidance/ucm070107.pdf](http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidance/ucm070107.pdf) - 138
23. ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).

## 부록 1. 시험법 숙련을 위한 시험물질

*In Chemico* 피부감작 시험법 : 펩타이드 반응성 시험법 (Direct Peptide Reactivity Assay, DPRA)

본 시험법 가이드라인에 따라 DPRA를 시작하기에 앞서 표 1의 10개 물질에 대하여 DPRA 예측을 정확하게 판정하는지 또한 시스테인과 리신 소실율이 10개의 숙련도 시험물질 중 8개의 물질에서 표1에 제시된 참고 범위 안에 들어오는지 파악하여 숙련도를 입증하여야 한다. 이러한 숙련도 물질들은 피부감작 유해성의 전체 범위를 나타낼 수 있도록 선정된 것이다. 또한 상업적으로 구입 가능한 것, 고품질의 *in vivo* 참고 데이터와 DPRA로 얻은 *in vitro* 데이터가 있는 것, EURL ECVAM 검증연구에서 이 시험법의 성공적인 수행을 설명하기 위해 참여 실험실에서 사용되었던 것 등이 선정 시 고려한 것이다.

표 1: DPRA 시험법 숙련을 위한 시험물질

숙련도 물질	CASRN	성상	<i>In vivo</i> 예측력 <sup>1</sup>	DPRA 예측력 <sup>2</sup>	시스테인 펩타이드 소실율 범위(%)	리신 펩타이드 소실율 범위(%)
2,4-Dinitrochlorobenzene	97-00-7	고체	고도 강감작 (extreme)	양성	90-100	15-45
Oxazolone	15646-46-5	고체	고도 강감작 (extreme)	양성	60-80	10-55
Formaldehyde	50-00-0	액체	강감작 (strong)	양성	30-60	0-24
Benzylideneacetone	122-57-6	고체	중감작 (moderate)	양성	80-100	0-7
Farnesal	19317-11-4	액체	약감작 (weak)	양성	15-55	0-25
2,3-Butanedione	431-03-8	액체	약감작 (weak)	양성	60-100	10-45
1-Butanol	71-36-3	액체	비감작	음성	0-7	0-5.5
6-Methylcoumarin	92-48-8	고체	비감작	음성	0-7	0-5.5
Lactic Acid	50-21-5	액체	비감작	음성	0-7	0-5.5
4-Methoxyacetophenone	100-06-1	고체	비감작	음성	0-7	0-5.5

<sup>1</sup>In vivo 예측력은 LLNA data에 근거한다<sup>(19)</sup>. 그 in vivo 예측력은 ECETOC에서 제안서 분류기준을 사용한 것이다.

<sup>2</sup>DPRA 예측력은 통합독성평가의 맥락에서 고려되어야 하며 II-2 and II-4 항에서 제시된 내용과도 일치해야 한다.

<sup>3</sup>이 범위는 6 개의 독립적인 실험실에서 얻어진 10 개의 소실값을 근거로 하여 결정된 값이다.

## 부록 2. 분석 순서의 예

검량표준액과 참고대조군	표준액1 표준액2 표준액3 표준액4 표준액5 표준액6 희석에 사용된 완충액 참고대조군 A, 1회 참고대조군 A, 2회 참고대조군 A, 3회
동시용출 대조군	시험물질1에 대한 동시용출 대조군 시험물질2에 대한 동시용출 대조군
참고대조군들	참고대조군 B, 1회 참고대조군 B, 2회 참고대조군 B, 3회
첫 번째 반복시험	참고대조군 C, 1회 Cinnamic aldehyde, 1회 시험물질1, 1회 시험물질2, 1회
두 번째 반복시험	참고대조군 C, 2회 Cinnamic aldehyde, 2회 시험물질1, 2회 시험물질2, 2회
세 번째 반복시험	참고대조군 C, 3회 Cinnamic aldehyde, 3회 시험물질1, 3회 시험물질2, 3회
참고대조군들	참고대조군 B, 4회 참고대조군 B, 5회 참고대조군 B, 6회

3 개의 참조군(예, 적당한 용매에 녹인 펩타이드만으로 구성된 시료들) 분석시료 리스트에 포함되어져야 한다.

참고대조군 A : HPLC 분석시스템의 적합성을 입증하기 위해 사용됨

참고대조군 B : HPLC 분석시간 동안 참고대조군의 안전성을 입증하기 위해 분석시료 리스트의 처음과 끝에 포함됨

참고대조군 C : 시험물질을 녹이기 위해 사용된 용매가 펩타이드 소실율에 영향을 주지 않음을 입증하기 위해 분석리스트에 포함됨

## 화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인(VIII)

---

발행일	2016월 5월
발행처	식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 바이오생약심사부 화장품심사과
편집위원	이윤제, 이정표, 김정근, 김도정, 김선희, 권경진, 이주연, 조미란, 박소영 (화장품심사과) 손수정, 김태성, 김주환, 고경육, 이정선, 안일영 (특수독성과)

---