

등록번호

안내서-1058-01

**화장품 피부감작성 동물대체시험법
(In chemico 아미노산 유도체 결합성을
이용한 시험법) 가이드라인
(민원인 안내서)**

2020. 9.



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

독성평가연구부 특수독성과

지침서·안내서 제·개정 점검표

명칭

**화장품 피부자극 동물대체시험법(In chemico 피부감작성 시험법)
가이드라인(민원인 안내서)**

아래에 해당하는 사항에 체크하여 주시기 바랍니다.

| | | |
|--|---|---|
| 등록대상 여부 | <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. | | |
| 지침서·안내서 구분 | <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 |
| 기타 확인 사항 | <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. | |
| 상기 사항에 대하여 확인하였음. | | |
| 2020년 9월 30일 | | |
| 담당자 확 인(부서장) | | 방서영 윤혜성 |

이 안내서는 화장품 피부부식성 동물대체시험법(인체피부모델을 이용한 피부부식 시험법) 가이드라인에 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 2019년 월 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: 043-719-5153, 5155

팩스번호: 043-719-5150

제·개정 이력

| 연번 | 제·개정번호 | 승인일자 | 주요내용 |
|----|--------|------|--|
| 1 | | | 화장품 피부감작성 동물대체시험법 가이드라인(민원인 안내서) 제정 |

목 차

| | |
|--|----|
| I. 개요 | 6 |
| II. 시험원리 | 7 |
| III. 제한점 및 고려사항 | 7 |
| IV. 시험방법 | 8 |
| V. 인정요건 | 13 |
| VI. 시험결과 및 보고 | 14 |
| - 별첨 1 : 번역본 (OECD TG 442C 서론) | |
| - 별첨 2 : 번역본 (OECD TG 442C 부속서 II) | |
| - 별첨 3 : 원문 (OECD TG 442C Introduction, Appendix 1B) | |

화장품 피부감작성 동물대체시험법 (아미노산 유도체 결합성 시험, ADRA) 가이드라인

I. 개요

본 시험법은 피부감작 독성발현경로(Adverse Outcome Pathway, AOP)에서 분자 수준의 초기현상인 피부 단백질의 반응성을 평가하는 방법으로서, UN GHS 기준에 따라 피부감작물질과 비감작물질을 구별하는 화학적(*in chemico*) 시험법(아미노산 유도체 결합성 시험법, Amino acid Derivative Reactivity Assay, ADRA)이다.

본 시험법은 시험물질을 시스테인 유도체인 N-(2-(1-naphthyl)acetyl)-L-cysteine (NAC) 및 라이신 유도체인 α -N-(2-(1-naphthyl)acetyl)-L-lysine (NAL)를 $25\pm 1^\circ\text{C}$ 에서 24 ± 1 시간 동안 반응시킨 후 HPLC 분석을 통해 시스테인 유도체 및 라이신 유도체의 잔여 농도를 정량하여 소실율(percent depletion)을 계산한다. NAC와 NAL의 소실율을 근거로 예측모델에 따라 시험물질의 피부감작성과 비감작성을 구별한다.

본 시험법의 단백질 반응성에 대한 정보만으로는 시험물질의 피부감작성 유무를 결론짓기 어려우며, 본 시험법으로 얻어진 데이터는 다른 생체외(*in vitro*) 시험법들과 비시험법(기존 유사화합물에 대한 정보 등)으로부터 얻어진 다른 정보들과 조합하여 피부감작 통합독성평가(IATA) 맥락에서 사용될 수 있도록 한다.

본 시험법을 사용하는 실험실은 가이드라인에서 제시된 10개의 숙련도 물질을 사용하여 기술적 숙련도를 입증해야 하고, 가이드라인에서 제시하고 있는 인정요건 모두를 만족시키는 결과값만이 유효한 것으로 인정된다.

II. 시험원리

이 시험법은 시험물질과 2종류의 아미노산 유도체인 -(2-(1-naphthyl)acetyl)-L-cysteine (NAC, CAS. 32668-00-1) 및 α -N-(2-(1-naphthyl)acetyl)-L-lysine(NAL, CAS. 397841-92-8)를 각각 $25\pm 1^\circ\text{C}$, 24 ± 1 시간 동안 반응시킨 후에 NAC 및 NAL의 상대농도를 281 nm에서 고성능 액체 크로마토 그래피(HPLC)로 측정하여, NAC 및 NAL의 소실율을 계산하고 그 값에 따라 감작성물질과 비감작성물질을 판정한다. 이 시험법 단독으로 감작성등급결정 및 안전성평가에 활용하는 것은 완전하지 않으며, 따라서 다른 시험법과 함께 보조적으로 통합독성평가(Integrated Approaches to Testing and Assessment, IATA)방법을 적용할 필요가 있다.

III. 제한점 및 고려사항

ADRA는 액체크로마토그래프법에 경험이 있는 실험실에서 전수할 수 있다.

본 시험법은 단백질과 공유결합을 하여 반응하는 물질에만 적용 가능하므로 금속 화합물의 평가에 적용할 수 없다. 또한 본 가이드라인의 시험법은 대사 시스템을 포함하고 있지 않으므로 피부감작성을 나타내기 위하여 효소에 의한 활성화 단계를 거쳐야 하는 화학물질(pro-haptens)들은 이 시험법으로 측정할 수 없지만, 일부 비생물학적 변형을 거쳐 피부감작성을 나타내는 화학물질(pre-haptens)들은 본 시험법으로 정확하게 측정할 수 있다고 보고된다. 따라서 본 시험법에서의 음성 결과는 시험법의 제한점과 통합독성평가의 틀에서 다른 정보와 연관하여 해석하여야 한다. NAC 시약의 산화를 촉진하는 시험물질은 위양성으로 예측될 수 있다. HPLC으로 측정된 NAC 이량체는 모두 검출 및 정량할 수 있으므로, 시험물질과의 공유 결합이 아닌 산화적 이합체화를 통해 NAC 시약이 고갈된 경우는 확인하고 제외시킬 수 있다.

본 시험으로 평가하기 위해서는 시험물질이 적절한 용매에 최종농도, 1 mM로 용해되어야 한다. 이 농도에서 녹지 않는 시험물질인 경우 녹을 수 있는 낮은 농도에서 시험할 수 있다. 이 경우, 양성 결과는 시험물질을 피부감작으로 식별하는데 이용할 수 있지만 음성 결과인 경우, 반응성이 없다는 결론을 내릴 수 없다.

DPRA는 유기화합물이 흡수하는 UV 파장 범위인 220 nm에서 정량하므로 시험물질과 친핵성을 같이 용출할 경우 위음성 예측 가능성이 있으나 ADRA는 281 nm에서 정량하여 공용리 가능성을 크게 낮추어 위음성의 확률을 낮출 수 있다.

본 예측모델은 시험물질과 친핵성 시약 간의 몰 비율이 정의되어 있어, 조성이 알려져 있지 않은 혼합물과 조성이 알려져 있지 않거나 다양한 조성을 가진 화합물, 복잡한 반응산물 및 생물학적 물질 (UVCB 물질들)에는 사용할 수 없다.

ADRA는 피부감작성과 비감작성을 구분하는데 사용될 수 있다. ADRA 결과를 다른 정보들과 조합하여, 피부감작성 강도를 평가하는데 기여할 수 있는지 파악하기 위해서는 추가적인 데이터(특히, 인체 데이터에 바탕을 둔 연구)가 요구된다.

IV. 시험방법

4.1 NAC 및 NAL의 품질

순도 > 98%의 NAC 및 NAL 저장용액을 사용하여 대조군을 준비하고, 제조 직후(0시간) 및 24시간 후에 NAC 및 NAL의 잔류 수준을 정량화 하여 안정성을 확인한다. NAC 및 NAL의 잔류 수준은 최소 90%여야 한다. NAC의 잔류 수준은 NAC의 함에 대한 NAC이량체의 잔류수준의 백분율로 계산된다. NAC 및 NAL을 별첨 2. 의 부록 1에

제시된 10 종의 숙련도 물질과 반응시켰을 때 해당하는 반응 결과를 보일 때 비로서 본 실험이 적절하게 수행될 수 있다고 인정된다.

4.2 NAC 및 NAL의 Stock 용액의 제조

NAC 저장용액은 EDTA 0.333 μ M이 함유된 100 mM의 pH 8.0 인산완충액에서 2 mM로, NAL 저장용액은 100 mM의 pH 10.2 인산완충액에서 2mM로 조제한다.

4.3 시험물질의 제조

시험물질의 적절한 용매로는 증류수, 아세토니트릴 및 아세톤 등이다. 시험물질이 앞의 용매 중 어느 것에도 용해되지 않으면, 시험물질을 DMSO에 용해시킨 다음 아세토니트릴로 20배 희석하여 1 mM의 농도로 제조 한다.

4.4 양성대조군, 참고대조군, 동시용출 대조군의 제조

- 1) 양성대조군: 페닐아세트알데히드(Phenylacetaldehyde, CAS 122-78-1, \geq 90% 순도)를 아세토니트릴에 1 mM 농도로 용해한 것을 사용한다.
- 2) 참고대조군 (별첨 2. 의 부록 2 참고): 참고대조군(Reference control)은 시험물질을 제외하고 용매(부형제)와 NAC 및 NAL을 혼합한 용액으로서 아래와 같은 용도에 사용된다. 권장하고 있는 참고대조군의 목록은 부록에 제시하였다.
 - 전체분석 전에 HPLC 분석시스템의 적합성을 확인하는 데 사용(참고대조군 A)
 - 시간경과에 따른 참고대조군의 안정성을 확인하는 데 사용(참고대조군 B)
 - 시험물질용해에 사용된 용매가 NAC 및 NAL의 소실율에 영향을 주지 않는다는 것을 확인하기 위해 사용(참고대조군 C)
- 3) 동시용출 대조군: NAC 및 NAL와 함께 시험물질이 동시에 용출될 가능성을 검출하기 위해 사용하며, 분석대상 반응물 각각에 대해 시험물질만을 단독으로 조제한 용출대조물질을 동시에 분석에 포함해야 한다.

4.5 NAC 및 NAL용액과 시험물질의 혼합반응

- 1) NAC 및 NAL용액은 각각 1:50 비율로 시험물질과 혼합반응 시킨다. 이때, 화학물질 용해도로 인해 침전이 관찰되지 않는 것을 확인하여야 한다.
- 2) 혼합반응은 유리재질의 바이알에서 시행한다.

- 3) 반응용액은 HPLC 분석을 실행하기 전에 25±1℃ 암실에서 24±1 시간 동안 반응시킨다.
- 4) 배양 후 반응을 멈추기 위해 트리플루오로아세트산(TFA, Trifluoroacetic acid, ≥ 98%)을 고정용액으로 첨가한다.

4.6 HPLC 준비와 분석

- 1) 각 시험물질은 NAC 및 NAL에 대해 3 번 반복분석을 수행한다.
- 2) HPLC 시행 전, 시료에서 육안으로 침전물이 발견되거나 상 분리가 일어나는 경우 필요시 저속(100 X g ~ 400 X g)으로 원심분리하고 바이알 바닥의 침전물을 제거한다. 이러한 경우 위음성 결과가 나오지 않는지 유의한다.
- 3) NAC 및 NAL 저장용액 (stock solution, 5.0 μM)에 대해 희석용 완충액만을 사용한 Blank용액 및 계열희석방법을 사용하여 5.0 μM ~ 0.156 μM의 농도범위에 해당하는 6 개의 표준용액을 제조하여 표준 검량선을 만든다.
- 4) 분석을 하기 전 최소 두 번 적절한 용매로 HPLC 시스템을 작동시켜 평형상태로 만든다.
- 5) HPLC 분석은 0.30 mL/min의 유속으로, 선형농도구배로 NAC의 경우 30% ~ 55%, NAL의 경우 25% ~ 45%로 아세토니트릴용액농도를 증가시키면서 10 분간 수행한다. 유속 또는 선형농도구배 등은 시험조건에 따라 적절히 조절 가능하다.
- 6) 각 표준용액과 분석대상시료 및 대조물질 모두 같은 부피로 컬럼에 주입한다. 매 시료를 주입하기 전에 컬럼을 재평형(re-equilibrated) 시킨다.
- 7) 흡광도는 281 nm에서 측정한다. 광다이오드어레이검출기를 사용하는 경우, 291 nm에서의 흡광도를 측정한다.

4.7 결과의 처리

- 1) 각 반응시료의 NAC 및 NAL의 농도를 281 nm에서 측정하며, 해당 피크의 면적(곡선 아래면적, AUC)을 측정한 후 NAC 및 NAL의 표준곡선에 대입하여 각 반응시료 내의 NAC 및 NAL농도를 산출한다.
- 2) NAC 및 NAL의 소실율은 각 피크의 면적을 측정한 후 아래의 식에 따라 참고대조군 C(별첨 2.의 부록 2 참고)의 평균 피크면적으로 나누어 계산한다.
- 3) NAC와 NAL의 소실율은 각 검체시료에서 피크면적을 구하고 이것을 참고대조군 C의 평균 피크면적으로 나눈 값으로 결정한다. 구하는 식은 다음과 같다.

$$NAC \text{ 또는 } NAL \text{의 소실 백분율} = \left[1 - \left[\frac{\text{시료의 } NAC \text{ 또는 } NAL \text{ 피크면적}}{\text{참고대조군의 } NAC \text{ 또는 } NAL \text{ 피크면적 평균}} \right] \right] \times 100$$

4.8 예측모델

1) 각 시험물질에 대해 NAC 및 NAL 소실율을 계산한다. 평균을 계산할 때 음의 소실율은 "0"으로 간주한다. 표 1에 제시된 수치를 기반으로 예측판정을 수행한다. 단, 이러한 예측은 오로지 화학물질의 단백질 반응성만으로는 감작성판단의 기준이 되기 어렵다는 것을 전제로 한다.

표 1. NAC/NAL 예측 판정모델

| NAC 및 NAL 평균 소실율) | 판정모델 |
|-------------------|------|
| < 4.9% | 음성 |
| 4.9% ≤ | 양성 |

2) 시험물질 자체가 281 nm파장을 흡수하여 피크에 영향을 주는 동시용출이 NAC 및 NAL 모두에서 발생하고, 용출시간의 분리가 불가능한 경우 분석결과는 “결론미정”으로 보고한다. 동시용출이 NAL에 대해서만 발생하고 용출 시간의 분리가 불가능할 경우에는 표 2에 보고된 NAC 단독 예측모델을 사용할 수 있다.

표 2. NAC 단독 판정모델

| NAC 평균 소실율(%) | 판정모델 |
|---------------|------|
| < 5.6% | 음성 |
| 5.6% ≤ | 양성 |

3) NAC/NAL 예측판정모델에서 평균 소실율(%)이 3.0% ~ 10.0% 범위에 존재하거나, NAC 단독 예측모델에서 NAC 소실율(%)이 4.0% ~ 11.0% 범위에 존재하게 되면 재시험을 수행한다.

V. 인정요건

아미노산유도체 결합성 시험법은 다음의 인정요건을 충족해야 한다.

1. HPLC 측정이 유효한 것으로 간주하려면 다음과 같은 조건을 충족하여야 한다. 아래 기준 중 하나라도 충족되지 않으면 다시 시험하여야 한다.
 - 1) 표준검량선의 R^2 은 0.990보다 커야 한다.
 - 2) 양성대조군인 페닐아세트알데히드에 대한 3 번 반복 측정 값의 평균 소실을 결과가 다음과 같아야 한다.
 NAC: 6%~30% (표준편차 10% 미만)
 NAL: 75%~100% (표준편차 10% 미만)
 - 3) 참고대조군 A 및 C의 평균 NAC 및 NAL농도는 3.2 μM ~4.4 μM 이어야 하며, 아세토니트릴에 용해한 9 종의 참고대조군 B와 C의 펩티드 피크 면적의 변동계수 (Coefficient of Variation)는 10% 미만이어야 한다.

2. 시험물질에 대한 결과가 유효하려면 다음 사항이 만족되어야 한다. 아래 기준을 만족하지 않으면 시험결과를 폐기하고 다시 시험하여야 한다.
 - 1) 시험물질의 반복측정에 대한 최대 표준편차는 NAC 및 NAL 모두 10% 미만이어야 한다.
 - 2) 3 개의 참고대조군 C의 평균 NAC 및 NAL농도는 3.2 μM ~4.4 μM 이어야 한다.

VI. 시험결과 및 보고

시험보고서는 다음의 사항을 포함한다.

시험물질

- 단일성분 화합물
 - IUPAC 또는 CAS 명칭, CAS 번호, SMILES 또는 InChI 코드, 구조식 및/또는 다른 식별 정보 등과 같은 화학 물질 정보
 - 물리적 성상, 용해도, 분자량, 시험과 관련된 추가적인 물리화학적 특성(가능한 범위로)
 - 순도, 불순물의 적절하며 실제에 맞는 화학 물질 종류
 - 시험 전 처리방법(가온, 분쇄)
 - 시험 농도
 - 보관 조건과 안정성(가능한 범위로)

- 다성분 화합물, UVCB, 혼합물
 - 특징: 성분들의 화학 물질 정보, 순도, 함량, 시험과 관련된 물질의 물리화학적 특성

- (가능한 범위로)
- 물리적 성상, 용해도, 시험과 관련된 추가적인 물리화학적 특성(가능한 범위로)
 - 이미 조성이 알려져 있는 혼합물/중합체의 분자량(또는 겉보기 분자량), 또는 시험과 관련된 다른 정보
 - 시험 전 처리방법(가온, 분쇄)
 - 시험 농도
 - 보관 조건과 안정성(가능한 범위로)

대조군

- 양성대조군
 - IUPAC 또는 CAS 명칭, CAS 번호, SMILES 또는 InChI 코드, 구조식 및/또는 다른 식별 정보 등과 같은 화학 물질 정보
 - 물리적 성상, 용해도, 분자량, 시험과 관련된 추가적인 물리화학적 특성(가능한 범위로)
 - 순도, 불순물의 적절하며 실제에 맞는 화학물질 종류
 - 시험 전 처리방법(가온, 분쇄)
 - 시험 농도
 - 보관 조건과 안정성(가능한 범위로)
 - 가능하다면, 판정 기준의 적합성을 설명할 만한 양성대조군 결과에 대한 참고문헌
- 용매
 - 사용된 용매 및 그 성분들의 비율
 - IUPAC 또는 CAS 명칭, CAS 번호 및/또는 다른 식별 정보 등과 같은 화학 물질 정보
 - 순도, 불순물의 적절하며 실제에 맞는 화학물질 종류
 - 가이드라인에서 제시되지 않은 용매를 사용하였을 경우 이들의 물리적 성상, 분자량, 시험과 관련된 추가적인 물리화학적 특성
 - 보관 조건과 안정성(가능한 범위로)
 - 용매 선택의 근거(각각의 시험물질에 대한 용매 선정의 근거)
 - 아세토니트릴을 사용할 경우, NAC와 NAL의 안정성에 미치는 영향

NAC와 NAL, 양성대조군, 시험물질 용액의 제조

- NAC와 NAL 용액의 특징(공급자, 로트, NAC와 NAL의 정확한 무게, stock 용액에 첨가된 양)
- 양성대조군의 용액의 특징(양성대조군 물질의 정확한 무게, 대조군 용액에 첨가된 양)
- 시험물질 용액의 특징(시험물질의 정확한 무게, 시험용액에 첨가된 양)

HPLC 기기 세팅 및 분석 조건

- 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 281 nm에서 NAC와 NAL의 피크면적
- 직선 표준검량곡선을 그림으로 제시하고 R^2 표시
- 각각의 참고대조군 A의 NAC와 NAL 농도
- 3개의 참고대조군 A 시료의 NAC와 NAL 농도(의) 평균(μM), 표준편차, 변동계수
- 참고대조군 A와 C의 NAC와 NAL 농도

분석 순서

- 참고대조군
 - 참고대조군 B와 C의 281 nm에서 NAC와 NAL의 피크면적
 - 아세트니트릴에 녹인 9개의 참고대조군 B와 C의 NAC와 NAL의 피크면적 평균, 표준편차, 변동계수(분석시간 동안의 안정성 확인을 위한 참고대조군)
 - 각각의 사용한 용매에 대해서는 3 개의 참고대조군 C의 281 nm에서 NAC와 NAL 피크면적 평균(NAC와 NAL 소실을 계산 목적)
 - 사용한 용매별 3 개의 적당한 참고대조군 C의 NAC와 NAL 농도(μM)
 - 사용한 용매별 3 개의 적당한 참고대조군 C의 NAC와 NAL 농도(μM) 평균, 표준편차, 변동계수
- 양성대조군
 - 각 양성대조군 시료의 281 nm에서 NAC와 NAL 피크면적
 - 각 양성대조군 시료의 NAC와 NAL 소실을
 - 3 개의 양성대조군 시료의 NAC와 NAL 소실을 평균, 표준편차, 변동계수
- 각각의 시험물질
 - 반응 후 반응액에서 침전물의 형성 여부. 침전물의 재용해 또는 원심분리 여부
 - 동시용출 여부
 - 기타 특이사항의 설명
 - 각 시험물질의 281 nm에서 NAC와 NAL 피크면적
 - 각 시험물질의 NAC와 NAL 소실을
 - 3개의 시험물질의 NAC와 NAL 소실을 평균, 표준편차, 변동계수
 - NAC와 NAL 소실율의 평균
 - 사용된 예측모델과 ADRA 예측

숙련도 시험

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

고찰

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

결론

별첨 1. 번역본(OECD TG 422C)

피부감작 독성발현경로 핵심 단계인 단백질 공유결합에 대응한 핵심 단계 기반 *In Chemico* 피부감작성 시험법

Key - Event-Based Test Guideline For *In Chemico* Skin Sensitisation Assays Addressing The Adverse Outcome Pathway Key Event On Covalent Binding To Proteins

개요

1. UN GHS(United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals)의 정의에 따르면 피부감작물질은 피부에 반복적으로 접촉했을 때 알레르기 반응을 일으키는 물질을 말한다(1). 피부감작에 기반이 되는 주요 생물학적 기전에 대해서 합의된 견해가 있다. 피부감작 관련 화학적/생물학적 기전들에 대한 현재 지식들은 피부감작의 분자수준의 시작단계에서 중간 단계를 거쳐 유해영향 즉, 알레르기성 접촉 피부염에 도달하는 독성발현경로(Adverse Outcome Pathway, AOP)로 요약될 수 있다(2). 이 독성발현경로는 유기 화합물질과 같이, 아미노산 잔기 (즉, 시스테인 또는 라이신)와 반응하는 물질에 중점을 두고 있다. 이 경우 분자 수준의 시작단계(즉, 첫 번째 핵심 단계)는 피부 단백질의 친핵성(nucleophilic) 중심 부에 친전자성(electrophilic) 물질이 공유결합하는 것이다. 독성발현경로의 두 번째 핵심 단계는 각질형성세포(keratinocyte)에서 일어나고, 염증반응뿐만 아니라 항산화/친전자성 반응 요소 의존 경로(antioxidant/electrophile response element (ARE) dependent pathways)와 같은 특정 세포 신호전달 경로와 연관된 유전자 발현의 변화가 포함된다. 세 번째 핵심 단계는 수지상 세포의 활성화로서, 일반적으로 세포의 특정 표면표지자, 케모카인, 사이토카인의 발현으로 평가된다. 네 번째 주요 단계는 T-세포 증식이다.

2. 피부감작성의 평가는 일반적으로 실험동물을 이용한다. 기니픽을 이용한 전통적인 방식인 Magnusson와 Kligman의 Guinea Pig Maximization Test(GPMT)와 Buehler Test - OECD TG 406(11) 시험법은 피부감작의 유도기와 유발기를 모두 평가하는 방법이다. 설치류를 이용하는 시험법인 국소 림프절 시험법(LLNA, OECD TG 429(12)) 및 3개의 LLNA의 비방사성 변형 시험법 - LLNA: DA(OECD TG 442A(13)), LLNA: BrdU-ELISA,

BrdU-FCM(OECD TG 442B(14)) - 은 모두 유도기의 반응만을 평가하는 방법이다. 이 방법들은 유도기의 피부감작능을 객관적으로 측정할 수 있는 것과 함께 동물복지 면에서 기니픽 시험법보다 이점이 있기 때문에 피부감작성 시험법으로 인정되었다.

3. 피부감작성에 대한 독성발현경로의 초기 핵심 세 단계를 설명하는 기전 근거 *in chemico*와 *in vitro* 시험법이 화학물질의 피부감작 유해가능성 평가를 위해 채택되었다: 본 시험 가이드라인은 첫 번째 핵심 단계인 단백질에 공유적 결합을 평가한다; OECD TG 442D는 두 번째 핵심 단계인 각질형성세포의 활성화를 평가한다(15); OECD TG 442E는 세 번째 핵심 단계인 수지상 세포의 활성화를 평가한다(16). 마지막으로 네 번째 핵심 단계인 T-세포 증식은 마우스 국소림프절시험법을 통해 간접적으로 평가한다(12).

본 핵심 단계 기반 시험 가이드라인에 포함된 시험법들의 배경과 원리

4. 본 시험 가이드라인(TG)은 피부감작성에 대한 독성발현경로의 첫 번째 핵심 단계인 단백질 공유결합(covalent binding) 기전(2)과 관련되는 *in chemico* 분석법을 설명하고 있으며, UN GHS (1)에 따라 피부감작물질과 비감작물질을 구별하는데 사용되는 시험법들로 구성되어 있다. 현재 본 시험 가이드라인에서 설명하는 시험법은 다음과 같다.

- The Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) (부록 I)
- The Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA) (부록 II).

5. 위 두 가지 시험법은 단백질에 대한 *in chemico* 공유결합을 기반으로 하며 과학적으로 타당하다고 간주된다. 이 중 DPRA는 동물대체시험법에 대한 유럽동물대체시험법검증센터(EURL ECVAM) - 주도 검증 연구에 이어 유럽과학자문위원회(EURL ECVAM Scientific Advisory Committee(ESAC))에 의한 독립적인 전문 평가가 이루어졌다(3)(4)(5). ADRA는 일본동물대체시험법검증센터(Japanese Center for the Validation of Alternative Methods, JaCVAM)(6)(7)(8)(9)가 주관한 검증연구가 수행되었고, 이어 독립적인 전문 평가가 이루어졌다(10).

6. 본 시험 가이드라인에 포함된 시험법은 데이터 생산 과정에 관해서는 다를 수 있으나 단백질 반응성 시험 결과에 대한 각국의 요구사항을 만족시키는데 사용되며, 데이터 상호 인정(Mutual Acceptance of Data)의 적용을 받을 수 있다.

7. 피부감작 가능성과 단백질 반응성과의 상관성은 잘 확립되어 있다(17)(18)(19). 하지만 단백질 반응성은 피부감작 독성발현경로의 단지 하나의 핵심 단계이기 때문에(2)(20), 이 특정 핵심 단계를 표적으로 한 시험법으로 생성된 정보는 화학물질의 피부감작성 유무를 결론짓기 위한 독립적인 방법으로는 충분하지 않다. 따라서 본 시험 가이드라인의 시험법들로 도출된 데이터는 피부감작 독성발현경로의 다른 핵심 단계와 관련된 *in vitro* 시험법 또는 *in silico* 모델링이나 화학물질 유사체의 판독 등의 비시험방법으로부터 얻은 추가적인 정보와 함께 통합독성평가(Integrated Approaches to Testing and Assessment [IATA])내에서 사용될 때 피부감작물질(예, UN GHS 카테고리 1)과 비감작물질을 구별하는데 이용된다(20). 이 시험법들로부터 도출된 데이터 사용에 대한 예시는 규정된 접근법(Defined Approaches [DAs]), 즉 사용된 정보 소스와 예측값 도출에 사용되는 절차에 대한 표준화된 접근 방식이 발표되었으며(20), 통합독성평가(IATA)에서 유용한 요소로 활용될 수 있다.

8. 본 시험 가이드라인에 기술된 시험법들은 두 개의 하위 분류를 사용하는 정부기관에서 피부감작물질을 UN GHS에 정의된 1A, 1B로 하위 분류하는 것이 가능하지 않으며, 안전성 평가 결정을 위한 감작 정도의 예측도 가능하지 않다. 그러나 규제 체계에 따라 본 시험법들에서 나온 양성 결과는 그 자체로 UN GHS 카테고리 1으로 분류하는데 이용할 수 있다.

9. 용어 정의는 부록에 서술되어 있다. *in vitro* 피부감작성 시험법인 DPRA 및 ADRA와 유사 또는 일부 변경된 시험법의 평가를 위한 유사시험평가기준(Performance Standards)이 개발되었다(22).

참고문헌

(1) United Nations (UN) (2017), Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Seventh revised edition, New York and Geneva, United Nations Publications. Available at:

[https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev07/07files_e0.html]

(2) OECD (2012), Series on Testing and Assessment No. 168. The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available

at:[http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En)

(3) GF Gerberick, Vassallo JD, Bailey RE, Chaney JG, Morrall SW, Lepoittevin JP (2004), Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. *Toxicol Sci.* 81, 332-343.

(4) GF Gerberick, Vassallo JD, Foertsch LM, Price BB, Chaney JG, Lepoittevin JP (2007), Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: a classification tree model approach. *Toxicol Sci.* 97, 417-427. .

(5) EC EURL-ECVAM (2013), Recommendation on the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) for the skin sensitisation testing Available at:

https://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/eurlecvam-recommendaion-on-the-directpeptide-reactivity-assay-dpra.

(6) M Fujita, Yamamoto Y, Tahara H, Kasahara T, Jimbo Y, Hioki T (2014), Development of a prediction method for skin sensitisation using novel cysteine and lysinederivatives. *J PharmacolToxicol Methods.* 70, 94-105.

(7) Y Yamamoto, Tahara H, Usami R, Kasahara T, Jimbo Y, Hioki T, Fujita M.(2015) A novel *in chemico* method to detect skin sensitisers in highly diluted reactionconditions. *J Appl Toxicol.* 35, 1348-1360.

(8) M Fujita, Yamamoto Y, Watanabe S, Sugawara T, Wakabayashi K, Tahara K, Horie N, Fujimoto K, Kusakari K, Kurokawa Y, Kawakami T, Kojima K, Kojima H, Ono A, Katsuoka Y, Tanabe H, Yokoyama H and Kasahara T (2019), Cause of and Countermeasures for Oxidation of the Cysteine-Derived Reagent Used in the Amino acid Derivative Reactivity Assay, *J. Appl. Toxicology*, Feb;39(2):191-208 (doi: 10.1002/jat.3707).

- (9) OECD (2019), Draft validation report: Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA) - JaCVAM Validation Study Report. Series on testing and Assessment n° 304. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (10) OECD (2019), Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA) - Report of the Peer Review Panel. Series on testing and Assessment n° 305. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (11) OECD (1992), OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 406. Skin Sensitisation. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- (12) OECD (2010), OECD Guidelines for Chemical Testing No. 429. Skin sensitisation: Local Lymph Node assay. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- (13) OECD (2010), OECD Guidelines for Chemical Testing No. 442A. Skin sensitisation: Local Lymph Node assay: DA. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- (14) OECD (2018), OECD Guidelines for Chemical Testing No. 442B. Skin sensitisation: Local Lymph Node assay: BrdU-ELISA or - FCM. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- (15) OECD (2018), OECD Key Event based test Guideline 442D: *In vitro* Skin Sensitisation Assays Addressing AOP Key Event on Keratinocyte Activation. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- (16) OECD (2018), OECD Key event based test Guideline 442E: *In Vitro* Skin Sensitisation Assays Addressing the Key Event on Activation of Dendritic Cells on the Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- (17) Landsteiner and Jacobs (1936), Studies on the sensitisation of animals with simple chemical compounds. *Journal of Experimental Medicine* 64:625-639.
- (18) Dupuis and Benezra (1982), Allergic contact dermatitis to simple chemicals: a molecular approach. New York & Basel: Marcel Dekker Inc.
- (19) JP Lepoittevin, Basketter DA, Goossens A, Karlberg AT (1998), Allergic contact

dermatitis: the molecular basis, Springer, Berlin (doi: 10.1007/978-3-642-80331-4).

(20) OECD (2016), Series on Testing & Assessment No. 256: Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Annex 1 and Annex 2. ENV/JM/HA(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<https://community.oecd.org/community/iatass>].

(21) B Wareing, Urbisch D, Kollé SN, Honarvar N, Sauer UG, Mehling A, Landsiedel R(2017) Prediction of skin sensitization potency sub-categories using peptide reactivity data, *Toxicol In Vitro* Dec;45(Pt 1):134-145 (doi: 10.1016/j.tiv.2017.08.015).

(22) OECD (2019), Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation DPRA and ADRA test methods, Series on Testing & Assessment No. 303, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

부록1 - 용어정의

정확도(Accuracy) : 시험결과와 참고치의 일치 정도. 시험 수행에 대한 평가 척도이고 상관성(relevance)의 한 측면이다. 시험결과의 정확도를 의미하는 "일치성(concordance)"과 같은 의미로 종종 쓰임(1).

(아래 표시된 공식 참고.)

ADRA : 아미노산 유도체 반응성 시험법 (Amino acid Derivative Reactivity Assay)

독성발현경로(AOP, Adverse Outcome Pathway) : 분자 수준의 시작 단계를 거쳐서 in vivo 유해반응까지 표적 화합물 또는 유사한 화합물 그룹으로부터 일어나는 일련의 사건 (2).

계산(Calculation)

NAC 또는 NAL의 소실 계산

소실은 다음과 같이 계산한다.

NAC 또는 NAL의 소실율 = $\{1 - (\text{검체의 NAC 또는 NAL 피크면적} \div \text{참고대조군 C의 NAC 또는 NAL 피크면적 평균})\} \times 100$

예측력 계산

민감도, 특이도 및 정확도에서 일반적으로 사용되는 몇 가지 용어가 있다; TP (진양성), TN (진음성), FN (위음성) 및 FP (위양성).

민감도, 특이도 및 정확도는 TP, TN, FN 및 FP로 나타낸다.

민감도 : 진양성 화학물질 수 \div 모든 양성 화학물질 수, $TP \div (TP + FN)$

특이도 : 진음성 화학물질 수 \div 모든 음성 화학물질 수, $TN \div (TN + FP)$

정확도 : 정확한 예측값 \div 모든 예측값, $(TN + TP) \div (TN + TP + FN + FP)$

표준검량곡선(Calibration curve, standard curve) : 알려진 물질의 분석 농도(즉, 표준 검량 곡선)와 시험 반응 값과의 관계.

변동계수(Coefficient of variation) : 동일 반복시료로부터 얻은 데이터의 변동성을 나타내며 표준편차를 평균으로 나눈 값. 100을 곱하여 백분율로 나타냄.

규정된 접근법 (Defined Approach, DA) : DA는 예측값의 도출을 위해 정의된 정보 소스로 생성된 데이터(예, in silico 예측값, in chemico, in vitro 데이터)에 적용되는 정해진 데이터 해석 절차(즉, 통계적인, 수학적인 모델)로 구성된다.

DPRA : 펩티드 반응성 시험법 (Direct Peptide Reactivity Assay)

EDTA : 에틸렌다이아민테트라아세트산 (ethylenediaminetetraacetic acid)

EURL ECVAM : 유럽동물대체시험법검증센터

유해성(Hazard) : 생체, 생태계 또는 특정 집단이 화학물질에 노출될 때, 유해한 영향을 야기할 가능성이 있는 물질 또는 환경(situation)의 본질적 특성.

통합독성평가(IATA, Integrated Approach to Testing and Assessment) : 화학물질 또는 화학물질 그룹의 유해성 확인(잠재력), 유해성 결정(효력) 및/또는 안전성 평가(잠재력/효력, 노출)를 위하여 사용되는 구조적 접근 방법. 잠재적인 유해성 및/또는 위험성 및/또는 심화 추적 필요성에 관한 규제결정을 위하여 모든 관련 데이터를 전략적으로 통합하고 경중을 가림으로써 최소한의 시험만 수행하도록 함.

JaCVAM : 일본동물대체시험법검증센터

LLNA : 마우스를 이용한 피부감작성 시험인 국소림프절시험. 2010년 OECD 가이드라인 (TG 429)으로 승인됨.

분자적 초기 현상(Molecular Initiating Event) : 독성발현경로의 시작단계로서 분자 수준에서 화학물질에 의해 유도되는 생물계의 변화.

혼합물(Mixture) : 서로 반응하지 않는 두 가지 이상의 화학물질로 구성된 혼합물질 또는 용액(3).

단일성분 화합물(Mono-constituent substance) : 정량적인 조성으로 정의되며, 하나의 주요성분이 적어도 80% (w/w)이상인 물질.

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 화학반응 없는 두 가지 이상의 물질을 섞어서 얻고, 다성분 물질은 화학반응의 산물임.

NAC : N-(2-(1-naphthyl)acetyl)-L-cysteine(4)(5)(6)

NAL : α -N-(2-(1-naphthyl)acetyl)-L-lysine(4)(5)(6)

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.

Pre-haptens : 비생물학적 변형을 거쳐 피부감작성을 나타내는 화학물질.

Pro-haptens : 피부감작성을 나타내기 위하여 효소에 의한 활성화 단계를 거쳐야 하는 화학물질.

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 시험 계와 상호작용하는 지를 보여줌.

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(1).

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), 실험실 내 반복성(repeatability)으로 평가됨(1).

재현성(Reproducibility) : 동일한 방법으로 동일한 물질을 시험하였을 때 나온 결과의 일치(신뢰도 참조)(1).

민감도(Sensitivity) : 시험법으로 모든 양성/활성 물질이 정확하게 분류되는 비율. 민감도는 시험법의 범주 결정에 대한 정확도의 척도이며 시험법의 상관성을 평가하는 중요한 고려사항임(1).(아래 표시된 공식 참고.)

특이도(Specificity) : 시험법으로 모든 음성/비활성 물질이 정확하게 분류되는 비율. 특이도는 시험법의 범주 결정에 대한 정확도의 척도이며 시험법의 상관성을 평가하는 중요한 고려사항임(1).(아래 표시된 공식 참고.)

화합물(Substance) : 생산과정을 통해 얻어지거나 또는 자연상태의 화학원소들(elements)과 이들로 이루어진 구성물질(compound). 생산품의 안정성을 유지시키는데 필요한 첨가제와 생산과정에서 유래하는 불순물은 포함하지만 해당 물질의 안정성이나 조성의 변화에

영향없이 분리될 수 있는 용매는 제외함(3).

시스템 적합성(System suitability) : 분석 배치를 수행하기 전에 표준물질을 분석하여 기기 성능(예, 민감도)을 판정(7).

시험물질(Test chemical) : 시험 물질이라는 용어는 시험 대상 물질을 지칭하는 데 사용됨.

TFA : 트리플루오로아세트산 (Trifluoroacetic acid)

UN GHS (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) : 물리적, 보건적, 환경적 유해성의 수준 및 표준화된 유형에 따른 화학물질(화합물 또는 혼합물)의 분류 체계로, 그림문자, 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(3).

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.

유효한 시험법(Valid test method) : 특정한 목적에 대해 충분한 상관성과 신뢰도를 가지는 것으로 고려되는 시험법으로서 과학적으로 입증된 원리에 근거한 시험법. 절대적 의미에서 유효하지는 않지만 특정 목적에 관련됨(1).

참고문헌

- (1) 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.
- (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) 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
- (4) M Fujita, Yamamoto Y, Tahara H, Kasahara T, Jimbo Y and Hioki T (2014), Development of a prediction method for skin sensitisation using novel cysteine and lysine derivatives, *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 70:94-105.
- (5) Y Yamamoto, Tahara H, Usami R, Kasahara T, Jimbo Y, Hioki T and Fujita M (2015), A novel in chemico method to detect skin sensitisers in highly diluted reaction conditions, *Journal of Applied Toxicology*, 35(11):1348-60, (doi: 10.1002/jat.3139).
- (6) M Fujita, Yamamoto Y, Watanabe S, Sugawara T, Wakabayashi K, Tahara K, Horie N, Fujimoto K, Kusakari K, Kurokawa Y, Kawakami T, Kojima K, Kojima H, Ono A, Katsuoka Y, Tanabe H, Yokoyama H and Kasahara T (2019), Cause of and Countermeasures for Oxidation of the Cysteine-Derived Reagent Used in the Amino acid Derivative Reactivity Assay, *J. Appl. Toxicology*, Feb;39(2):191-208 (doi: 10.1002/jat.3707).
- (7) FDA (Food and Drug Administration) (2001), Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation 22pp. Accessible at: www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidance/ucm070107.pdf - 138 (23)

별첨 2. 번역본 (OECD TG 442C 부속서 II)

In Chemico ADRA를 이용한 피부감작

In Chemico Skin Sensitisation: Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA)

초기 고려사항, 적용 및 제한점

35. ADRA는 피부감작 독성발현경로에서 분자적 초기 현상, 즉 단백질 반응성, 시스테인 또는 라이신을 함유한 합성 아미노산 유도체 모델에 대한 시험물질의 반응성을 정량하여 평가한다(1)(2)(3). 시스테인과 라이신 유도체의 소실값은 피부감작성과 비감작성을 구별하는데 사용된다(1)(2)(3).

36. ADRA는 액체크로마토그래프법(High-performance liquid chromatography, HPLC)에 경험이 있는 실험실에 전수될 수 있음이 입증되었다. ADRA의 실험실 내 재현성은 4개 참여실험실에서 각각 100% (10/10), 100% (7/7), 90% (9/10) 및 100% (10/10)였으며, 3개 참여실험실의 결과로 계산된 40개의 시험물질에 대한 실험실 간 재현성은 91.9%였다(4). 4개 실험실에서 진행된 검증 연구에서 40개 시험물질에 대한 결과 정확도는 86.9% (139/160), 민감도는 81.5% (88/108), 특이도는 98.1% (51/52) 였다(4)(5). 검증연구 및 다른 연구(4)(5) 결과에서는 국소림프절시험법 (LLNA) 결과(6)와 비교시, 비감작으로부터 감작물질을 구별해내는 ADRA의 정확도는 79% (98/124)이며 (ADRA의 적용 가능 영역(Applicability Domain)에 속하는 124개의 물질에 대해) 민감도 74% (65/88), 특이도 92% (33/36) 였다. 또한 ADRA의 적용 가능 범주에 해당하는 73개의 물질에 대한 인체 피부감작 예측력은 정확도 86% (63/73), 민감도 85% (44/52) 및 특이도 90% (19/21)였다. 그러나 이 시험법은 통합독성평가의 맥락과 앞의 서론 단락 7과 8에 따라 다른 소스의 정보와 조합하여 사용하길 권고하기 때문에 독립적 시험법(Stand-alone)으로서 ADRA의 정확도 값은 참고치에 불과하다. 더욱이 피부감작성에 대한 비동물 시험법을 평가할 때, LLNA뿐 아니라 다른 동물시험법도 인체에 미치는 영향을 완전히 반영하지 못함을 고려해야 한다. 보고된 연구결과에 따르면 ADRA의 적용 가능 영역은 다양한 유기 작용기(organic functional group), 반응 기전, 피부감작성 강도(in vivo 시험에서 평가된) 및 이화학적 성질을 고려한다(1)(2)(3)(4). 독립된 전문평가에 이어서, ADRA 검증연구는 이 방법이 피부감작 유해성을 예측 관정하기 위한 통합평가전략의 일부로서 이용가능함을 입증한 것으로 여겨진다(7).

37. 본 가이드라인에서 사용된 “시험물질” 이라는 용어는 시험대상을 나타내며,

화합물(substances) 그리고/또는 혼합물(mixtures) 평가에 있어 ADRA의 적용가능성을 말하는 것은 아니다. 본 시험법은 금속 화합물의 평가에 적용할 수 없는데, 이는 금속 화합물이 공유결합이 아닌 다른 메커니즘으로 단백질들과 반응하는 것으로 알려져 있기 때문이다. 본 가이드라인의 부속문서에 설명된 시험법은 *in chemico* 방법으로, 대사시스템을 포함하고 있지 않다. 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(1)(2)(3)(4). 이러한 맥락에서, 이 시험법에서 얻어진 음성 결과는 명시된 시험법의 한계와 통합독성평가의 틀에서 다른 정보와 연관하여 해석되어야 한다. N-(2-(1-naphthyl)acetyl)-L-cysteine (NAC)의 산화(예, 시스테인 이합체화)를 촉진하는 시험물질인 경우 NAC 소실이 실제보다 과대평가될 수 있어, 위양성으로 예측될 수 있다(27과 28 단락 참조); 시험 항목 물질(들)과의 반응 및 공유 결합이 아닌 산화적 이합체화를 통해 NAC 시약이 고갈된 경우 이렇게 생성된 NAC 이량체 검출 및 정량이 HPLC에 의해 가능하기 때문에 이를 확인하고 제외시킬 수 있다.

38. ADRA 시험법으로 난용성 물질을 시험할 수 있다. 평가를 위해서는 시험물질은 적절한 용매에 최종농도, 1 mM로 용해되어야 한다(15 단락 참조). 이 농도에서 녹지 않는 시험물질인 경우 낮은 농도에서 시험할 수 있다. 이 경우, 양성 결과는 시험물질을 피부감작으로 식별하는데 이용할 수 있지만 음성 결과인 경우, 반응성이 없다는 결론은 내릴 수 없다.

39. 일반적으로, 많은 유기 화합물들은 220 nm 범위의 UV를 흡수한다. 친핵성 시약과 시험물질을 같이 용출할 경우 위음성 예측을 초래할 수 있다. 이러한 경우는 펩티드 기반 친핵성 시약의 정량을 220 nm에서 하는 DPRA에서 일어날 수 있다. 이와 대조적으로, ADRA에 사용되는 친핵성 시약은 281 nm에서 정량하며, 이 범위의 스펙트럼에서 UV를 흡수하는 물질은 일반적으로 공액 이중 결합을 갖는 물질로 제한되어 공유리 가능성을 크게 낮춘다(8).

40. 본 예측 모델은 시험물질과 친핵성 시약 간의 몰 비율이 정의되어 있어, 조성이 알려져 있지 않은 혼합물과 조성이 알려져 있지 않거나 다양한 조성을 가진 화합물, 복잡한 반응산물 및 생물학적 물질 (UVCB 물질들)에는 사용할 수 없다. 혼합물에 ADRA의 적용가능성에 대한 정보는 현재 제한적이다(9)(10). 친핵성 시약의 소실을 정량화하는 HPLC 분석인 ADRA 방법을 다성분 물질 및 혼합물의 평가에 사용하기 위해서는 새로운 프로토콜이 개발되어야 한다(9)(10). 따라서 다성분 물질 및 혼합물을 평가할 수 있는 방법을 이 가이드라인에서 정의하는 것은 불가능하지만, 현재 다성분 물질이나 조성이 알려진 혼합물에 적용하는 것을 고려하는 시험법은 단락 16에 설명되어 있다(9). 그러나 이 물질들은 검증연구에서 평가되지 않았다. 혼합물이나 시험하기 어려운

물질(예: 불안정한 물질) 또는 본 가이드라인의 적용 가능 영역 내에 명확히 포함되지 않은 물질을 시험할 때에는 그 결과가 과학적으로 의미 있는 결과를 산출할 것인지에 대해서 사전에 고려해야 한다.

41. ADRA는 피부감작물질과 비감작물질을 구분하는데 사용될 수 있다. ADRA 결과가 다른 정보들과 조합하여, 피부감작 정도를 평가하는데 기여할 수 있을지 파악하기 위해서는 추가 연구(특히, 인체 데이터에 바탕을 둔 연구)가 필요하다.

시험법의 원리

42. ADRA는 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 시험물질을 24 ± 1 시간 반응시킨 다음 시스테인 유도체인 N-(2-(1-naphthyl)acetyl)-L-cysteine (CAS. 32668-00-1) (NAC)과 라이신 유도체인 α -N-(2-(1-naphthyl)acetyl)-L-lysine (CAS. 397841-92-8) (NAL)의 잔여 농도를 정량하는 *in chemico* 방법이다. 이 두 유도체는 UV 검출을 용이하게 하기 위해 나프탈렌 고리가 N-말단에 도입되어 있다. NAC와 NAL의 상대농도(relative concentration)는 HPLC에서 구배용출(gradient elution)로 281 nm에서 흡광도를 측정하여 결정된다. 그리고 NAC와 NAL에 대해 소실값(depletion value)을 계산하여 예측 모델과 비교한다 (26 단락 참조).

43. 본 가이드라인의 시험법을 일반적으로 사용하기 전에 실험실은 부록 1에 수록된 10개의 숙련도 시험물질을 이용하여 기술적 숙련도를 입증하여야 한다.

시험절차

44. 본 시험법은 JaCVAM이 주관한 ADRA 검증 연구의 프로토콜에 근거하며, 실험실에 ADRA 도입시 사용하는 것을 권고한다. 다음은 ADRA의 주요 구성요소와 방법들에 대한 설명이다. 다른 대체 HPLC 설정을 사용하기 전에, 프로토콜에 설명된 검증된 설정과 동등하다는 것을 증명하여야 하며, 이 때 본 별첨의 부록 1의 시험물질을 이용한 숙련도 검사를 이용하는 것이 좋다.

NAC와 NAL의 품질

45. 친핵성 시약은 FUJIFILM Wako (FFWK) Pure Chemical Corporation에서 피부감작성 시험을 위한 ADRA 키트(카탈로그 번호 296-80901)로서 구입할 수 있다. NAC / NAL의 제조는 일본에서만 특허 등록되어 있으며 Fujifilm Corporation이 보유하고 있다. 따라서 다른 국가의 제조업체는 허가없이 NAC / NAL을 생산할 수 있다. 다른

NAC / NAL을 사용하는 경우 아래에 설명된 세가지 품질 기준을 충족해야 한다. 이러한 품질 기준을 충족시키기 위해 특별히 제조된 NAC와 NAL을 구매함으로써 품질 검사를 면제받고, ADRA 테스트를 지연없이 진행할 수 있다.

NAC와 NAL의 품질 기준

- 1) 순도: NAC와 NAL 모두 최소 98% 이상의 순도를 가져야 한다.
- 2) 안정성: NAC 및 NAL stock 용액을 사용하여, 시험물질이 들어가지 않은 기준 대조군을 준비하고, 제조 직후 (0 시간)와 24 시간 반응 후에 NAC 및 NAL의 잔류량을 정량한다. NAC 및 NAL의 잔류량은 둘 다 최소 90%이 되어야 한다(11). NAC의 잔류량은 NAC의 양과 NAC 이량체 잔류량의 합을 백분율로 계산한다.
- 3) 반응성: 부록 1의 10개 숙련도 물질로 NAC 및 NAL의 반응성을 평가해야 하며 그 기준을 충족해야 한다.

NAC와 NAL의 stock 용액의 제조

46. NAC와 NAL를 사용하기 전에 각각의 용해도를 확인해야 한다. NAC stock 용액은 0.333 μM 의 EDTA를 포함하여 pH 8.0의 100 mM 인산 완충액에서 2 mM의 농도로 제조 되어야 하며, NAL은 pH 10.2의 100 mM 인산 완충액에서 2 mM의 농도로 제조 되어야 한다. 이어서 이 2개의 stock 용액을 완충액에 희석시켜 6.667 μM 의 stock 용액을 제조한다. NAC 및 NAL의 stock 용액은 준비 후 가능한 빨리 사용해야 한다(3). 용액을 보관하는 경우에는 -75 $^{\circ}\text{C}$ 미만의 온도에서 최대 12개월까지 보관 가능하다. NAC 용액의 최종 농도는 pH 8.0 인산 완충액에서 5 μM 이고, NAL 용액의 최종 농도는 pH 10.2 인산 완충액에서 5 μM 이다.

시험물질의 제조

47. 분석하기 전 ADRA JaCVAM 프로토콜(11)에 따라서 적절한 용매에 시험물질이 녹는지 평가해야 한다. 적절한 용매는 시험물질을 완전히 녹여야 한다. ADRA 프로토콜은 시험물질을 과량의 NAC와 NAL과 반응시키기 때문에 투명한 물질 용액 형성여부를 육안으로 관찰하는 것만으로도 시험물질(다성분으로 이루어진 화합물 또는 혼합물)을 시험하는 경우에 있어서 모든 구성 성분들이 용해되었는지를 확인하는데 충분하다. 이 시험법에 있어서는 증류수, 아세토니트릴(acetonitrile)과 아세톤(acetone)이 적절한 용매로 사용된다. 만일 시험물질이 이들 용매 중 어느 것에서도 녹지 않는다면 마지막 선택으로 시험물질을 최소량의 DMSO에 녹일 수 있다. 그러나 DMSO는 친핵성 시약인 NAC (12)의 이합체화를 초래할 수 있으며, 그 결과 수용 기준 (acceptance criteria)을 충족시키기가 더 어려울 수 있다는 점을 유의해야 한다. DMSO를 사용할 경우 DMSO와

아세트니트릴의 1:20 혼합물(아세트니트릴에 5% DMSO를 첨가함)에 시험물질을 녹인다. DMSO-아세트니트릴 용매를 사용할 때에는 시험 물질을 DMSO에 용해시킨 후, 이 용액을 아세트니트릴로 20배 희석하여 1 mM 시험물질 용액을 제조해야 한다. DMSO의 사용이 NAC 시약의 이합체화를 증가시킨다면 이를 HPLC 분석을 통해 NAC 이합체를 검출하여 확인할 수 있다. 시험물질을 일회용 폴리프로필렌 튜브에서 미리 무게를 재고 시험 직전에 적당한 용매에 녹여 1 mM 용액을 만든다.

48. 분자량이 알려지지 않은 단일 성분 물질은 1 mM이 아닌 0.5 mg/mL의 농도의 시험물질 용액으로 시험한다(9). 특성이 잘 알려진 중합체는 단일 성분 화합물과 유사한 방식으로 평균 분자량을 기준으로 1 mM의 농도로 시험해야 한다.

49. 조성이 알려진 혼합물 및 다성분 물질은 다음과 같이 시험한다.

1) 액체: 일반적으로 희석하지 않고 시험한다. 하지만 시험물질의 용해도가 낮아 반응용액을 만들기 어려운 경우, 즉 용해되지 않거나, 흐림 현상 및 침전이 관찰되는 경우, 양성의 결과는 평가에 사용될 수 있지만, 음성의 결과는 명확하지 않으므로 적절한 주의를 기울여 해석해야 한다. 그러나 결과가 위양성일 수도 있기 때문에 주의해서 해석할 필요가 있다.

2) 고체: 시험물질은 1 mM 용액을 만들 때 사용 된 것과 같은 용매에 최대 용해 농도로 녹인다. 그런 다음 가능한 최고 농도를 녹인 용액을 희석되지 않은 혼합물로 시험한다. 하지만 시험물질의 용해도가 낮아 반응용액을 만들기 어려운 경우, 즉 용해되지 않거나, 흐림 현상 및 침전이 관찰되는 경우, 양성의 결과는 평가에 사용될 수 있지만, 음성의 결과는 명확하지 않으므로 적절한 주의를 기울여 해석해야 한다. 그러나 결과가 위양성일 수도 있기 때문에 둘다 주의해서 해석할 필요가 있다.

양성대조군, 참고대조군, 동시용출(Co-elution)대조군의 제조

50. 아세트니트릴에 1 mM 농도로 녹인 Phenylacetaldehyde(CAS 122-78-1; $\geq 90\%$ 순도)를 양성대조군으로 한다. 만일 시험 허용기준을 도출할 수 있는 배경 데이터가 있다면 중간 범위의 소실값을 갖는 다른 적당한 양성대조군도 이용할 수 있다. 추가적으로 적절한 용매에 용해된 NAC 또는 NAL만으로 구성된 참고대조군들을 HPLC 분석에 포함시켜야 한다. 이러한 참고대조군들은 HPLC 시스템의 적합성을 증명하기 위한 참고대조군 A, 시간 경과에 따른 참고대조군들의 안정성을 증명하기 위한 참고대조군 B, 사용된 용매의 NAC 또는 NAL의 소실에 대한 영향을 증명하기 위한 참고대조군 C가 있다(부록 2 참조). 각 시험 물질에 대한 적절한 참고대조군들은 그 시험물질에 대한 NAC 및 NAL 소실 백분율을 계산하기 위하여 이용된다(단락 23 참조). 또한 시험물질과 NAC 또는 NAL의 동시용출 가능성을 확인하기 위하여 오직 시험물질로만 구성된 동시용출 대조군을 시험에 포함해야 한다.

시험물질과 NAC 또는 NAL 용액의 반응

51. NAC와 NAL 용액 둘다 시험물질과 96-well 마이크로플레이트에서 1:50의 비율로 반응시킨다.

NAC와 NAL 용액에 시험물질을 첨가하고 나서 즉시 침전물이 관찰되면 낮은 용해도를 의미하며, 이 경우 시험물질이 용액에 얼마만큼 들어있는 것인지 정확히 알 수 없다. 그러므로, 양성 결과는 신뢰할 수 있으나 음성 결과는 명확하지 않으므로 해석에 주의해야 한다(1 mM 농도까지 용해되지 않는 물질의 시험에 관한 단락 4의 설명 참조). 반응용액은 HPLC 분석을 수행하기 전에 $25\pm 1^\circ\text{C}$ 의 암실에서 24 ± 1 시간 동안 반응시킨다. 반응 후 고정액(fixing solution)인 TFA (trifluoroacetic acid) ($\geq 98\%$)를 첨가해서 반응을 중지시켜야 한다(3).

HPLC 준비와 분석

52. NAC와 NAL 둘 다에 대한 소실율을 결정하기 위해 각 시험물질당 3개의 반복시료(triplicate)를 분석해야 한다. 고정액을 첨가하면 반응이 멈추지만, 가능한 빨리 측정하여야 하며, 고정액을 첨가한 후 3일 이내에는 반드시 반응 용액을 측정해야 한다. 예를 들어, NAC 및 NAL의 HPLC 분석을 2개의 96-well 마이크로플레이트로 각각 수행한다면, 시험물질, 양성대조군 및 시험에 사용된 각각의 용매 수에 근거한 적절한 수의 용매대조군을 포함하여 한번에 최대 34개의 샘플을 분석할 수 있으며, 3개의 반복시료로 수행해야 한다. 하나의 시험에서 분석되는 모든 반복시료는 동일한 배치의 NAC 및 NAL stock 용액을 사용해야 한다. 시험물질 및 대조군 용액은 HPLC 분석 전에 육안으로 검사해야 하며, 과량의 침전물이 HPLC의 관이나 칼럼을 막는 것을 막기 위해 낮은 속도(100~400 μg)로 원심분리하여 침전물을 바이알의 바닥으로 침전시킨다. 반응 기간 시작시 또는 이후 침전 또는 상 분리가 관찰되면, NAC 및 NAL 소실이 잘못 측정될 수 있음을 나타내며, 이 경우 음성 결과는 명확하지 않고, 해석에 주의해야 한다(위 참조).

53. NAC와 NAL 둘 다에 대한 표준검량곡선을 작성해야 한다. NAC와 NAL의 표준액(standard solution)은 둘다 0.5%의 trifluoroacetic acid를 포함하는 20% 아세트니트릴 완충액을 사용하여 준비한다. NAC의 경우 pH 8.0의 인산 완충액을, NAL의 경우는 pH 10.2의 인산 완충액을 사용한다. NAC와 NAL 원액 (5.0 μM)을 순차적으로 희석하여 5.0-0.156 μM 의 6개 검량액(calibration solution)과 함께 희석용 완충액의 blank를 준비한다. 적절한 표준검량곡선의 R^2 값은 0.990를 초과해야 한다.

54. 분석을 수행하기 전 HPLC 시스템의 적합성을 증명해야 한다. NAC와 NAL의

소실은 모두 UV 검출기 (광다이오드 배열 검출기 [photodiode array detector] 또는 281 nm에 고정된 파장 흡광도 검출기)를 장착한 HPLC로 분석한다. 적절한 칼럼을 HPLC 시스템에 장착한다. 검증된 프로토콜에 기술된 권고되는 HPLC 설정의 컬럼은 구성 입자: 코어-셸 타입 실리카겔, 입자 크기: 2.5~2.7 μm , 컬럼 크기: 3.0 \times 150 mm 칼럼이 선호된다. 이 역상 HPLC 칼럼을 포함한 전체 시스템은 사용 전에 40°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 30분 동안 흘려주어 평형을 이루도록 한다. 실제 분석 전에 적어도 두 번은 구배(gradient)를 시행하여 컬럼을 조절한다. HPLC 분석은 0.30 mL/분의 유속으로 10분 내에 아세토니트릴을 NAC에서는 30%에서 55%까지, NAL에서는 25%에서 45%까지 직선 구배로 증가시킨 후, 아세토니트릴 농도를 100%까지 급속하게 증가시켜 다른 물질들을 제거한다. 동일한 부피의 표준액, 시험물질 용액, 대조군 용액을 주입해야 한다. 칼럼은 주입 사이에 6.5분 동안 초기 조건에서 다시 평형을 이루도록 한다. 만약 다른 역상 HPLC 칼럼을 사용하는 경우, NAC나 NAL이 적절하게 용출 및 통합될 수 있도록 주입량(사용된 시스템에 따라 달라질 수 있으나, 일반적으로 10-20 μL 범위임)을 포함한 위에서 기술된 설정 변수를 조정해야 할 수도 있다. 중요한 것은, 만약 다른 HPLC 설정을 이용한다면 위에서 설명한 검증된 HPLC 설정과 동등하다는 것을 증명해야 하며, 이 때 가능한 한 부록 1의 숙련도물질을 시험한다. 흡광도는 281 nm에서 측정하며, 만약 광다이오드 배열 검출기를 이용한다면 291 nm에서 흡광도 또한 기록해야 한다. 주의할 것은 일부 아세토니트릴 배치는 NAC과 NAL의 안정성에 부정적 영향을 미치므로 새 배치의 아세토니트릴을 사용할 경우 이를 확인해야 한다. 281 nm와 291 nm에서 피크면적의 비는 동시 용출을 확인하는 지표로 사용될 수 있다. 각 시료의 피크면적 비가 대조군 시료 피크면적 비의 평균제곱값 (mean)의 90%~100% 범위에 있다면 동시 용출이 일어나지 않았다는 증거가 된다. HPLC 분석 순서의 예는 부록 2에 서술되어 있다.

55. 일부 시험물질은 NAC의 산화를 잠재적으로 촉진할 수 있다. NAC 이합체의 피크는 육안으로 확인할 수 있다. NAC의 이합체화가 일어나는지를 주의해야 하는데, 이는 NAC 소실율이 과대평가되어 위양성으로 판정될 수 있기 때문이다(26과 27단락 참조).

자료와 보고

데이터 판정

56. 각 시료의 NAC와 NAL의 농도는 281 nm에서 광도계로 측정하는데, 적절한 피크의 면적(곡선하면적, area under the curve: AUC)을 측정하고, 표준액으로부터 얻어진

직선검량곡선을 이용하여 NAC와 NAL의 농도를 계산한다.

57. NAC와 NAL의 소실율은 각 시료에서 피크면적을 구하고 이것을 참고대조군 C의 평균 피크면적으로 나눈 값으로 결정한다(부록 2 참조). 구하는 식은 다음과 같다.

$$\text{NAC 또는 NAL의 소실 백분율} = \left[1 - \left[\frac{\text{시료의 NAC 또는 NAL 피크면적}}{\text{참고대조군의 NAC 또는 NAL 피크면적 평균}} \right] \right] \times 100$$

허용기준

58. 다음의 기준을 충족시켜야 한다:

- 표준검량곡선에서 $R^2 > 0.990$ 이어야 한다,
- 양성대조군 phenylacetaldehyde에 대한 3개 반복시료의 NAC와 NAL 평균 소실율은 NAC는 6~30% 범위의 값, NAL은 75~100% 범위의 값을 나타내야 하며, 양성대조군 반복 시료들의 최대 표준편차(SD)가 NAC와 NAL의 소실율 모두에서 10% 미만이어야 한다.
- 참고대조군 A와 C의 NAC와 NAL 농도 평균이 3.2~4.4 μM 이어야 하고, 아세트니트릴에서 9개의 참고대조군 B와 C의 NAC와 NAL 피크의 변동계수(coefficient of variation: CV)는 10% 미만이어야 한다.

만약 이 기준 중 하나라도 충족시키지 못하면 데이터는 버리고 재시험해야 한다.

59. 시험물질의 결과가 유효하기 위해서는 다음의 기준을 충족시켜야 한다:

- 시험물질 반복 시료들의 최대 표준편차는 NAC와 NAL의 소실율 모두 10% 미만이어야 하며,
- 적절한 용매에서 3 개의 참고대조군 C의 NAC와 NAL 농도 평균은 3.2~4.4 μM 이어야 한다.

만약 이 기준 중 하나라도 충족시키지 못하면 데이터는 버리고 재시험해야 한다.

예측모델

60. 각각의 시험물질에 대한 NAC와 NAL 소실율의 평균값을 구한다. 평균 소실값을 계산했을 때, 음수이면 "0"으로 간주한다. 표 1에서 제시된 NAC/NAL 예측모델을 사용함에 있어서, 4.9%의 평균 소실율에 대한 역치는 통합독성평가 또는 규정된 접근법 (Defined approach)의 틀에서 피부감작 물질과 비감작 물질을 구별하기 위해 사용해야 한다.

표 1: NAC/NAL 예측모델¹

| NAC와 NAL의 평균 소실율 | ADRA 예측 ² |
|------------------|----------------------|
| < 4.9% | 음성 |
| 4.9% ≤ | 양성 |

1) 숫자는 통계적으로 생성된 기준값이며 측정의 정밀도와 관련이 없다.

2) ADRA 예측은 통합독성평가 틀 안에서 고려해야 하며 단락 2와 3의 조건을 따른다.

61. 동시 용출은 시험물질(단일 물질, 단일 또는 여러 가지 성분들로 구성된 다성분 화합물, 또는 혼합물)이 281 nm에서 상당한 흡광도를 나타내고 NAC 또는 NAL과 동일한 머무름시간을 가질 때 발생한다. 이러한 동시 용출은 시험물질과 NAC 또는 NAL의 용출 시간을 분리시키기 위해 HPLC 설정을 약간 조정함으로써 해결할 수 있다. 만약 동시 용출을 해결하기 위하여 다른 HPLC 설정을 사용한다면 부록 1의 숙련도 시험을 이용하여 검증된 설정과 동등하다는 것을 증명해야 한다. 동시 용출이 일어난다면 NAC와 NAL 피크의 면적을 구할 수 없고, 소실을 또한 계산할 수 없다. NAC와 NAL 둘 다에서 시험물질의 동시 용출이 발생하고 용출 시간의 분리가 불가능한 경우 분석결과는 “미결”로 보고한다. NAL에서만 동시 용출이 일어나고 용출 시간의 분리가 불가능한 경우, NAC 단독 예측모델(표 2 참조)을 이용하여 예측할 수 있다.

표 2: NAC 예측모델¹

| NAC의 평균 소실율 | ADRA 예측 ² |
|-------------|----------------------|
| < 5.6% | 음성 |
| 5.6% ≤ | 양성 |

1) 숫자는 통계적으로 생성된 기준값이며 측정의 정밀도와 관련이 없다.

2) ADRA 예측은 통합독성평가 틀 안에서 고려해야 하며 단락 2와 3의 조건을 따른다.

62. 시험결과가 명백하다면 시험물질의 NAC 와 NAL에 대한 한 번의 HPLC 분석으로 충분하다. 그러나 결과가 양성과 음성을 구분하는 기준점에 가까이 있을 때에는(즉, 경계결과) 추가 시험이 필요하다. 만약 NAC와 NAL 예측모델에서 소실율 평균이 3~10% 범위이거나 NAC 단독 예측모델에서 NAC 소실율이 4~11% 범위에 있다면 2차 시험이 권고된다. 또한, 두 번의 시험에서 서로 불일치한 결과가 나오면 3차 시험을 고려해야 한다.

시험보고서

63. 시험보고서에는 다음과 같은 정보를 포함하여야 한다.

시험물질

- 단일성분 화합물
 - IUPAC 또는 CAS 명칭, CAS 번호, SMILES 또는 InChI 코드, 구조식 및/또는 다른 식별 정보 등과 같은 화학 물질 정보
 - 물리적 성상, 용해도, 분자량, 추가적인 물리화학적 특성(가능한 범위로)
 - 순도, 불순물의 화학적 특징(적절하며 실제에 맞는)
 - 해당하는 경우 시험 전 처리방법(가온, 분쇄)
 - 시험 농도
 - 보관 조건과 안정성(가능한 범위로)
- 다성분 화합물, UVCB, 혼합물
 - 특징: 성분들의 화학 물질 정보, 순도, 함량, 물리화학적 특성(가능한 범위로)
 - 물리적 성상, 용해도, 추가적인 물리화학적 특성(가능한 범위로)
 - 조성이 알려져 있는 혼합물/중합체의 분자량(또는 겔보기 분자량), 또는 시험과 관련된 다른 정보
 - 해당하는 경우 시험 전 처리방법 (가온, 분쇄)
 - 시험 농도
 - 보관 조건과 안정성 (가능한 범위로)

대조군

- 양성대조군
 - IUPAC 또는 CAS 명칭, CAS 번호, SMILES 또는 InChI 코드, 구조식 및/또는 다른 식별 정보 등과 같은 화학 물질 정보
 - 물리적 성상, 용해도, 분자량, 추가적인 물리화학적 특성 (가능한 범위로)
 - 순도, 불순물의 화학적 특징 (적절하며 실제에 맞는)
 - 해당하는 경우 시험 전 처리방법 (가온, 분쇄)
 - 시험 농도
 - 보관 조건과 안정성 (가능한 범위로)
 - 가능하다면, 적절한 시험 인정요건을 설명하는 과거 양성대조군 결과에 대한 참고문헌
- 용매
 - 해당하는 경우 사용된 용매 및 그 성분들의 비율
 - IUPAC 또는 CAS 명칭, CAS 번호 및/또는 다른 식별 정보 등과 같은 화학 물질 정보

- 순도, 불순물의 화학적 특징 (적절하며 실제에 맞는)
- 가이드라인에서 제시되지 않은 용매를 사용하였을 경우 이들의 물리적 성상, 분자량, 추가적인 물리화학적 특성
- 보관 조건과 안정성 (가능한 범위로)
- 각각의 시험물질에 대한 용매 선정의 근거
- 아세토니트릴을 사용할 경우, NAC와 NAL의 안정성에 미치는 영향

NAC와 NAL, 양성대조군, 시험물질 용액의 제조

- NAC와 NAL 용액의 특징(공급자, 로트, NAC와 NAL의 정확한 무게, stock 용액에 첨가된 양)
- 양성대조군의 용액의 특징(양성대조군 물질의 정확한 무게, 대조군 용액에 첨가된 양)
- 시험물질 용액의 특징(시험물질의 정확한 무게, 시험용액에 첨가된 양)

HPLC 기기 세팅 및 분석

- HPLC 기기, HPLC 및 가드 칼럼, 검출기 및 자동시료주입기의 종류
- HPLC 분석과 관련한 지표: 칼럼 온도, 주입량, 유속, 구배

시스템 적합성

- 표준물질과 참고대조군 A 반복시료의 281 nm에서 NAC와 NAL의 피크면적
- 직선 표준검량곡선을 그림으로 제시하고 R² 표시
- 각각의 참고대조군 A 반복시료의 NAC와 NAL 농도
- 3개의 참고대조군 A 시료의 NAC와 NAL 농도(의) 평균(μ M), 표준편차, 변동계수
- 참고대조군 A와 C의 NAC와 NAL 농도

분석 순서

- 참고대조군
 - 참고대조군 B와 C 반복시료의 281 nm에서 NAC와 NAL의 피크면적
 - 아세토니트릴에 녹인 9개의 참고대조군 B와 C의 281 nm에서 NAC와 NAL의 피크면적 평균, 표준편차, 변동계수(분석시간 동안 참고대조군의 안정성을 위한 것)
 - 각각의 사용한 용매에 대해서는 3 개의 참고대조군 C의 281 nm에서 NAC와

NAL 피크면적 평균(NAC와 NAL 소실을 계산 목적)

- 사용한 용매별 3 개의 적당한 참고대조군 C의 NAC와 NAL 농도(μM)
- 사용한 용매별 3 개의 적당한 참고대조군 C의 NAC와 NAL 농도(μM) 평균, 표준편차, 변동계수

- 양성대조군
 - 각 반복시료의 281 nm에서 NAC와 NAL 피크면적
 - 각 반복시료의 NAC와 NAL 소실율
 - 3 개의 반복시료의 NAC와 NAL 소실율 평균, 표준편차, 변동계수

- 각각의 시험물질
 - 반응 후 반응액에서 침전물의 형성 여부. 침전물의 재용해 또는 원심분리 여부
 - 동시용출 여부
 - 해당하는 경우 기타 특이사항의 설명
 - 각 반복시료의 281 nm에서 NAC와 NAL 피크면적
 - 각 반복시료의 NAC와 NAL 소실율
 - 3개의 반복시료의 NAC와 NAL 소실율 평균, 표준편차, 변동계수
 - NAC와 NAL 소실율의 평균
 - 사용된 예측모델과 ADRA 예측

숙련도 시험

- 해당되는 경우, 실험실의 시험법 숙련도시험 과정(예, 숙련도물질 시험) 또는 시험법의 재현성 확보과정

고찰

- ADRA 시험결과의 고찰

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

결론

참고문헌

- (1) Fujita M, Yamamoto Y, Tahara H, Kasahara T, Jimbo Y and Hioki T (2014), Development of a prediction method for skin sensitisation using novel cysteine and lysine derivatives, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 70:94-105. DOI: 10.1016/j.vascn.2014.06.001.
- (2) Yamamoto Y, Tahara H, Usami R, Kasahara T, Jimbo Y, Hioki T and Fujita M (2015), A novel *in chemico* method to detect skin sensitisers in highly diluted reaction conditions, *Journal of Applied Toxicology*, 35:1348-60. DOI: 10.1002/jat.3139.
- (3) Fujita M, Yamamoto Y, Watanabe S, Sugawara T, Wakabayashi K, Tahara K, Horie N, Fujimoto K, Kusakari K, Kurokawa Y, Kawakami T, Kojima K, Kojima H, Ono A, Katsuoka Y, Tanabe H, Yokoyama H and Kasahara T (2019), Cause of and Countermeasures for Oxidation of the Cysteine-Derived Reagent Used in the Amino acid Derivative Reactivity Assay, *Journal of Applied Toxicology*, 39,191-208. DOI: 10.1002/jat.3707.
- (4) Fujita M, Yamamoto Y, Watanabe S, Sugawara T, Wakabayashi K, Tahara Y, Horie N, Fujimoto K, Kusakari K, Kurokawa Y, Kawakami T, Kojima K, Sozu T, Nakayama T, Kusao T, Jon R, Kleinstreuer N, Bae-Hwa K, Kojima H, Kasahara T, Ono A, The within and between-laboratory reproducibility and predictive capacity of the *in chemico* Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA): Results of validation study implemented in four participating laboratories, *Journal of Applied Toxicology*, accepted on May 10, 2019
- (5) OECD (2019), Draft validation report: Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA) - JaCVAM Validation Study Report. Series on testing and Assessment n° 304. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (6) Yamamoto Y, Fujita M, Wanibuchi S, Sato A, Katsuoka Y, Ono A, Kasahara T. (2019), Availability of ADRA for prediction of skin sensitization by combining multiple alternative methods. *Journal of Toxicological Sciences*, accepted on May 9, 2019
- (7) OECD (2019), Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA) - Report of the Peer Review Panel. Series on testing and Assessment n° 305. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (8) Fujira M, Yamamoto Y, Wanibuchi S, Katsuoka Y, Kasahara T, (2019), The underlying factors that explain why nucleophilic reagents rarely co-elute with test chemicals in the ADRA. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 96, 95-105. DOI: 10.1016/j.vascn.2019.02.004
- (9) Yamamoto Y, Fujita M, Manibuchi S, Katsuoka Y, Ono A, Kasahara T.. (2019), Expanding the applicability of the Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA):

Determining a weight concentration for preparation of test chemical solutions that yields a predictive capacity identical to the conventional method using molar concentration and demonstrating the capacity to detect sensitizers in liquid mixtures. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 97, 67-79. DOI: 10.1016/j.vascn.2019.01.001

(10) Fujita M, Yamamoto Y, Wanibuchi S, Katsuoka Y, Kasahara T A Newly Developed Means of HPLC Fluorescence Analysis for Predicting the Skin Sensitization Potential of Multi-Constituent Substances Using ADRA. *Toxicology In Vitro*, 59, 161-178. DOI: 10.1016/j.tiv.2019.04.014.

(11) ADRA protocol: JaCVAM Statements. Available at: http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html

(12) James P. Tam JP, Cui Rong Wu CR, Wen Liu W, Jing Wen Zhang JW. (1991), Disulfide bond formation in peptides by dimethyl sulfoxide. Scope and applications. *Journal of the American Chemical Society*, 113, 6657 - 6662. DOI: 10.1021/ja00017a044

(13) Natsch A, Ryan CA, Foertsch L, Emter R, Jaworska J, Gerberick F, Kern P. (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitisation undergoing prevalidation. *Journal of Applied Toxicology*, 33(11):1337-52, DOI:10.1002/jat.2868.

(14) Gerberick GF, Vassalo JD, Foertsch LM, Price BB, Chaney JG, Lepoittevin J-P, (2007), Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: A classification tree model approach, *Toxicological Sciences*, 97, 417-427. DOI: 10.1093/toxsci/kfm064.

(15) Basketter DA, Scholes EW, (1992), Comparison of the local lymph node assay with the guinea pig maximization test for the detection of a range of contact allergens, *Food and Chemical Toxicology*, 30, 65-69.

(16) ECETOC (2003). Contact sensitisation: 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 : 아미노산 유도체 반응성 시험법 (Amino acid Derivative Reactivity Assay, ADRA)

본 시험법 가이드라인에 따라 ADRA를 시작하기에 앞서 표 1의 10개 물질에 대하여 ADRA 예측을 정확하게 판정하는지 또한 NAC와 NAL 소실율이 10개의 숙련도 시험물질 중 8개의 물질에서 표1에 제시된 참고 범위 안에 들어오는지 파악하여 숙련도를 입증해야 한다. 이러한 숙련도 물질들은 피부감작 유해성의 전체 범위를 나타낼 수 있도록 선정된 것이다. 또한 상업적으로 구입 가능한 것인지, 고품질의 *in vivo* 참고 데이터와 ADRA 데이터가 있는 것인지, 이 시험법의 성공적인 수행을 입증하기 위해 JaCVAM 검증연구에서 사용되었던 것인지 등이 물질 선정 시 고려되었다.

표 1: ADRA 시험법 숙련도 시험물질

| No. | 시험물질 | CAS No. | 성상 | 분자량 | In vivo 예측력 ¹ | ADRA 예측력 ² | 소실율 범위(%) | |
|-----|----------------------------|------------|----|--------|-----------------------------|--------------------------|------------------|------------------|
| | | | | | | | NAC ³ | NAL ³ |
| 1 | p-Benzoquinone | 106-51-4 | 고체 | 108.09 | 고도 강감작 (extreme) | 양성 | 90~100 | 40~70 |
| 2 | Chloramine T trihydrate | 7080-50-4 | 고체 | 281.69 | 강감작 (strong) | 양성 | 90~100 | 90~100 |
| 3 | Trans-Cinnamaldehyde | 14371-10-9 | 액체 | 132.16 | 중감작 (moderate) | 양성 | 40~100 | ≤20 |
| 4 | Palmitoyl Chloride | 112-67-4 | 액체 | 274.87 | 중감작 (moderate) | 양성 | ≤10 | 50~100 |
| 5 | Imidazolidinyl urea | 39236-46-9 | 고체 | 388.29 | 약감작 (weak) | 양성 | 10~45 | ≤10 |
| 6 | Farnesal | 19317-11-4 | 액체 | 220.35 | 약감작 (weak) | 양성 | 20~40 | ≤15 |
| 7 | Glycerol | 56-81-5 | 액체 | 92.09 | 비감작 | 음성 | ≤7 | ≤7 |
| 8 | Benzyl alcohol | 100-51-6 | 액체 | 108.14 | 비감작 | 음성 | ≤7 | ≤7 |
| 9 | Dimethyl isophthalate | 1459-93-4 | 고체 | 194.19 | 비감작 | 음성 | ≤7 | ≤7 |
| 10 | Propyl paraben | 94-13-3 | 고체 | 110.11 | 비감작 | 음성 | ≤7 | ≤7 |

1) In vivo 예측력은 국소립프절시험법 data에 근거한다(13)(14)(15). 그 in vivo 예측력은 ECETOC에서 제안서 분류기준을 사용한 것이다(16).

2) ADRA 예측력은 통합독성평가의 맥락에서 고려되어야 하며 단락 2와 3에서 제시된 내용과도 일치해야 한다.

3) 이 범위는 5 개의 독립적인 실험실에서 얻어진 10 개의 소실값을 근거로 하여 결정된 값이다.

부록 2. 분석 순서의 예

HPLC 분석에서 각 샘플은 아래의 순서대로 분석해야 한다. HPLC 분석에 대한 순서 예시는 HPLC 아래의 샘플 분석 순서 표를 참조한다.

1. 검량표준액과 참고대조군 A의 분석을 시행한다. (N=3)
2. 기준 용액과 참고대조군 A의 분석이 되었다면, 그 후 동시용출 대조군을 교대로 분석할 필요가 없다.
3. 참고대조군 B는 샘플, 참고대조군 C 및 양성대조군 분석 전후로 3번씩 (총 6번) 분석해야 한다.
4. 참고대조군 C, 양성대조군 및 시험 용액을 분석한다. (각 샘플의 첫 번째 반복시료 세트를 분석한 후 두 번째 반복시료 세트를 분석해야 한다.)

| | |
|--------------|--|
| 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 Phenylacetaldehyde, 1회 시험물질1, 1회 시험물질2, 1회 |
| 두 번째 반복시험 | 참고대조군 C, 2회 Phenylacetaldehyde, 2회 시험물질1, 2회 시험물질2, 2회 |
| 세 번째 반복시험 | 참고대조군 C, 3회 Phenylacetaldehyde, 3회 시험물질1, 3회 시험물질2, 3회 |
| 참고대조군들 | 참고대조군 B, 4회 참고대조군 B, 5회 참고대조군 B, 6회 |

3 개의 참조군(예, 적당한 용매에 녹인 NAC 또는 NAL로 구성된 시료들)이 분석시료 리스트에 포함되어야 한다.

참고대조군 A : HPLC 분석시스템의 유효성을 입증하기 위한 대조군. 참고대조군 A는 각 검량곡선에서 아세트니트릴을 첨가한 후(시험물질이 아님) NAC와 NAL의 농도를 확인하는데 사용됨.

참고대조군 B : 분석 중인 반응용액의 안정성을 입증하기 위한 대조군. 참조대조군 B는 분석시료 리스트의 처음과 끝에 포함되어, 아세트니트릴을 첨가한 후(시험물질이 아님) 3 개 각각의 NAC / NAL 피크 면적의 변동계수를 확인하는데 사용됨.

참고대조군 C : 각 시험 용액의 NAC / NAL 소실율을 계산하기 위한 대조군. 시험물질 대신 용매를 첨가한 3개의 참고대조군 C를 측정하여 NAC / NAL의 소실율을 계산함. 시험물질을 용해시키는데 사용되는 모든 용매에 대해 참고대조군 C를 준비함.