

등록번호

안내서-1060-01

**화장품 광독성 동물대체시험법**  
**[활성산소종을 이용한 광독성 시험법]**  
**가이드라인**  
(민원인 안내서)

2020. 9.



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

**독성평가연구부 특수독성과**

# 지침서·안내서 제·개정 점검표

**명칭**

**화장품 광독성 동물대체시험법(활성산소종을 이용한 광독성 시험법)  
가이드라인(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>2020년 9월 30일</b>		
<b>담당자 확 인(부서장)</b>		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 광반응성 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 495)
- 별첨 3 : 원문 (OECD TG 495)

# 화장품 광반응성 동물대체시험법 (활성산소종 측정을 이용한 광반응성 시험법) 가이드라인

## I. 개요

본 시험법은 인공 태양광이 조사된 시험물질에서 생성된 활성산소종(ROS, reactive oxygen species)을 측정하여 시험물질의 광반응성(photoreactivity)을 평가하는 시험법(활성산소종을 이용한 광반응성 시험법, ROS Assay for Photoreactivity)이다.

광독성 반응의 초기 단계는 발색단(chromophore)의 들뜸(excitation)을 유도하는 파장의 광자를 흡수하는 것으로, 과산화물 음이온(SA, superoxide anion) 및 일중항 산소(SO, singlet oxygen) 등의 활성산소종이 생성된다. 활성산소종 분석에서는 분광광도계로 560 nm에서 니트로블루테트라졸륨(NBT)의 환원을 측정하여 SA의 생성을 측정할 수 있으며, SO는 440 nm에서 이미다졸의 산화로 탈색된(bleaching) p-니트로소디메틸아닐린(RNO)을 측정하여 검출할 수 있다.

본 시험법은 시험물질을 각각 RNO 및 NBT와 혼합하고 인공 태양광 조사기를 이용하여 1시간 동안 광원에 노출시킨 후, 440 nm와 560 nm에서 흡광도를 측정한다. 광 조사 전과 후의 흡광도를 측정하여 생성된 SO와 SA 양을 계산하고, 예측 모델에 따라 시험물질의 광반응성을 평가한다.

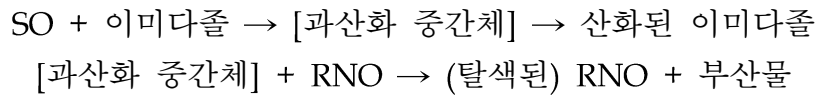
본 시험법을 사용하는 실험실은 가이드라인에서 제시된 숙련도 물질을 사용하여 기술적 숙련도를 입증해야 하고, 가이드라인에서 제시하고 있는 인정요건 모두를 만족시키는 결과값만이 유효한 것으로 인정된다.

## II. 시험원리

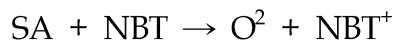
본 시험법은 분자 내 발색단(Chromophore)의 들뜸(Excitation)을 유도하는 특정 파장의 광독성 반응에서 들뜸 에너지가 산소 분자에 전달되어 생성되는 과산화물 음이온 (SA), 일중항산소 (SO) 등의 활성산소종을 측정함으로써 시험물질의 잠재적 광독성을 예측하는 시험법이다.

SO 생성은 p-니트로소디메틸아닐린(RNO)의 탈색 정도를 측정하여 검출한다. 단,

SO와 RNO는 화학적으로 반응하지 않으므로, imidazole 고리 화합물에 의해 SO가 과산화 중간체로 전환된 후 RNO의 탈색을 유도하게 된다.



SA 생성은 니트로블루테트라졸륨(NBT)의 환원 정도를 측정하여 검출한다. SA는 전자 하나를 전달함으로써 안정한 중간체인 모노포르마잔(NBT<sup>•-</sup>)을 생성하며 이를 560 nm에서 분광광도계로 측정할 수 있다.



### III. 제한점 및 고려사항

시험법의 적용을 고려하기 전에 시험물질의 자외선-가시광선 흡수 스펙트럼을 확인하고, 만약 제시된 몰 흡광계수(MEC, Molar Extinction Coefficient) 값이 1,000 L • mol<sup>-1</sup> • cm<sup>-1</sup> 이하일 경우에는 추가적인 시험이 필요하지 않다. 이 시험법을 이용한 분석에서 음성으로 판정된 시험물질은 생체 내 시험 시스템에서 음성일 가능성이 있지만, 양성으로 판정된 물질이 생체 내에서 양성일지를 결정하기 위해서는 추가 시험이 필요할 수 있다. 아스코르빈산이나 피부 미백 화장품 성분과 같은 환원 시약들은 ROS 측정 과정을 방해할 수 있으므로 주의한다.

### IV. 시험방법

#### 4.1 인공 태양광 조사기(Solar simulator)

실제 태양광을 시험에 사용할 경우, 위치나 시간의 차이에 따른 광반응성의 차이가 우려되기 때문에 인공 태양광 조사기가 사용된다. UVC 파장은 줄이고 가능한 한 실외 태양광과 유사한 광도를 유지하기 위해 권장되는 실험조건은 아래와 같다. 단, ROS 생성은 온도에 의해 영향을 받기 때문에 인공 태양광 조사기의 표준 설정 온도는 25°C로 설정하며, 광조사 기간 중 허용 온도는 20°C ~ 29°C 범위이다.

- 1) 290 nm 미만의 UV 파장을 줄이기 위한 필터가 부착된 경우(Suntest CPS/CPS+, Atlas)
  - 에너지조사 : 1 시간 동안 1.8 mW/cm<sup>2</sup> ~ 2.2 mW/cm<sup>2</sup>

- UVA의 조사 강도 :  $6.5 \text{ J/cm}^2 \sim 7.9 \text{ J/cm}^2$

2) 300 nm 미만의 UV 파장을 줄이기 위한 필터가 부착된 경우 (SXL-2500V2, Seric)

- 에너지 조사 : 1 시간 동안  $3.0 \text{ mW/cm}^2 \sim 5.0 \text{ mW/cm}^2$

- UVA의 조사 강도 :  $11 \text{ J/cm}^2 \sim 18 \text{ J/cm}^2$

#### 4.2 퀴츠반응용기 (Quartz reaction container)

자외선이 플라스틱 뚜껑을 통과하는 동안 조사량이 감소하거나, 광조사 과정에서 반응 혼합물이 증발되는 것을 막기 위해 그림 1과 같은 석영 반응 용기가 사용된다.

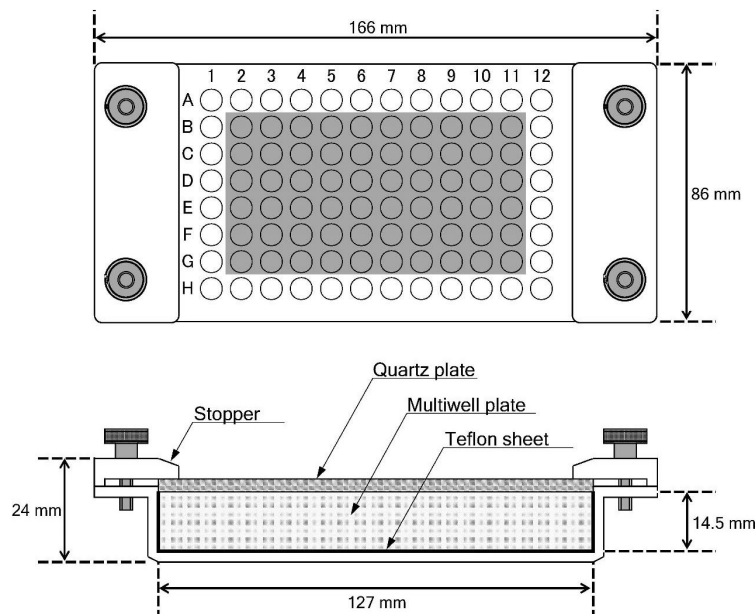


그림 1. 석영 반응 용기의 모식도

#### 4.3 시약

1) 20 mM 인산나트륨 완충액 (NaPB), pH 7.4: 593 mg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (CAS No. 13472-35-0) 및 5.8 g의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (CAS No. 10039-32-4), 900 mL의 정제수를 첨가하고, HCl을 사용하여 pH를 7.4로 맞춘 후 정제수로 1 L를 맞추어 희석하고 혼합한다. 냉장 보관 혹은 실온 보관한다.

2) 0.2 mM p-니트로소디메틸아닐린 (RNO, CAS No. 138-89-6): 100 mL의 20 mM NaPB에 3 mg의 RNO를 녹인다. 냉장 보관 및 차광한다.

3) 0.2 mM 이미다졸 (CAS No. 288-32-4): 10 mL의 20 mM NaPB에 13.6 mg의 이미다졸을 녹인다. 20mM 이미다졸 용액을 20 mM NaPB로 100배 희석한다. 냉장 보관 및 차광한다.



4) 0.4 mM 염화 니트로블루테트라졸륨 (NBT, CAS No. 298-83-9): 100 mL의 20 mM NaPB에 32.7 mg의 NBT를 녹인다. 냉장 보관 및 차광한다.

#### 4.4 시험물질

- 1) 시험물질의 최종 농도는 200  $\mu$ M로 조제하며, 200  $\mu$ M 반응액 상에서 침전, 발색 등이 나타날 경우에는 20  $\mu$ M로 조제한다. 이 경우, 20  $\mu$ M에서 양성 결과를 얻게 된다면 광반응성을 보인다고 판정할 수 있지만, 20  $\mu$ M에서 음성 결과를 보인다고해도 광반응성을 보이지 않는다고 판정할 수는 없다.
- 2) 용매는 DMSO (Dimethyl sulfoxide)를 사용하되, DMSO에 녹지 않는 물질은 20 mM NaPB를 용매로 사용한다.

#### 4.5 양성/음성 대조물질

양성대조물질로는 퀴닌 하이드로클로라이드 (CAS No. 6119-47-7), 음성대조물질로는 솔리소벤존 (CAS No. 4065-45-6)을 사용한다. 대조물질의 저장액(Stock solution)은 모두 DMSO를 사용하여 10 mM로 조제하고, 튜브에 소분하여 -20°C에서 한 달까지 보관할 수 있다.

#### 4.6 숙련도 시험

이 시험을 일상적으로 수행하여 시험결과를 얻기 위해서는 우선 이 시험에 대한 실험실의 숙련도가 입증되어야 한다. 이 시험에 권장되는 2종의 인공 태양광 조사기 (Suntest CPS/CPS+ 또는 SXL-2500V2)에 대해서는 9개의 숙련도 시험물질(표1, 1번~9번), 그 외의 인공 태양광 조사기에 대해서는 17개의 숙련도 시험물질(표1, 1번~17번)에 대해 시험하고, SO 및 SA의 측정값이 표 1에 제시된 예측 결과와 일치하여야 한다.

표 1. 숙련도 물질에 대한 활성산소종 예상값 및 허용 범위

No.	Chemical <sup>1</sup>	CAS No.	SO <sup>2</sup>	SA <sup>2</sup>	Solvent	concentration
1	p-Aminobenzoic acid	150-13-0	-8 to 12	-11 to 7	DMSO	200 $\mu$ M
2	Benzocaine	94-09-7	-7 to 9	-7 to 17	DMSO	200 $\mu$ M
3	Doxycycline hydrochloride	10592-13-9	115 to 429	230 to 468	DMSO	200 $\mu$ M

4	Erythromycin	114-07-8	-15 to 11	-9 to 21	DMSO	200 μM
5	Fenofibrate	49562-28-9	77 to 203	-31 to 11	DMSO	20 μM
6	L-Histidine	71-00-1	-8 to 12	8 to 120	NaPB	200 μM
7	Norfloxacin	70458-96-7	131 to 271	57 to 161	DMSO	200 μM
8	8-Methoxy psoralen	298-81-7	31 to 137	0 to 126	DMSO	200 μM
9	Octyl salicylate	118-60-5	-5 to 11	-8 to 20	DMSO	20 μM
10	Acridine	260-94-6	182 to 328	121 to 243	DMSO	200 μM
11	Chlorpromazine hydrochloride	69-09-0	-56 to 70	66 to 106	DMSO	200 μM
12	Diclofenac	15307-79-6	34 to 416	47 to 437	DMSO	200 μM
13	Furosemide	54-31-9	31 to 225	-7 to 109	DMSO	200 μM
14	Ketoprofen	22071-15-4	120 to 346	77 to 151	DMSO	200 μM
15	Nalidixic acid	389-08-2	54 to 246	88 to 470	DMSO	200 μM
16	Omeprazole	73590-58-6	-221 to 103	30 to 216	DMSO	200 μM
17	Promethazine hydrochloride	58-33-3	20 to 168	-3 to 77	DMSO	200 μM

<sup>1</sup> 모든 화학물질은 고형이다.

<sup>2</sup> 모든 값은 검증 데이터의 평균±1.96SD로 계산되었다.

#### 4.7 시험 방법

1) 96 웰 플레이트를 사용하여 아래의 그림2와 같이 시험한다.

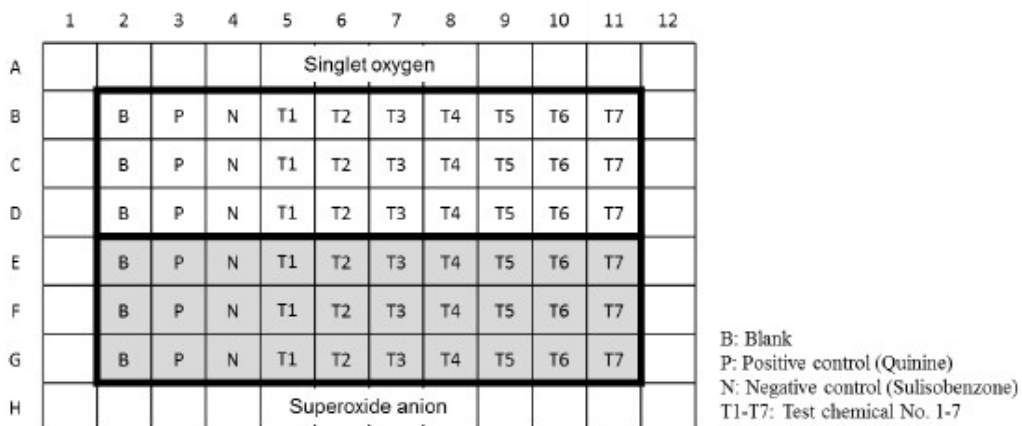


그림 2. 광반응 시험에서의 플레이트 배치도

2) DMSO를 용매로 하여 시험물질의 저장액을 조제한 경우에는 아래의 [그림3]과 같은 시험 순서를 따른다.

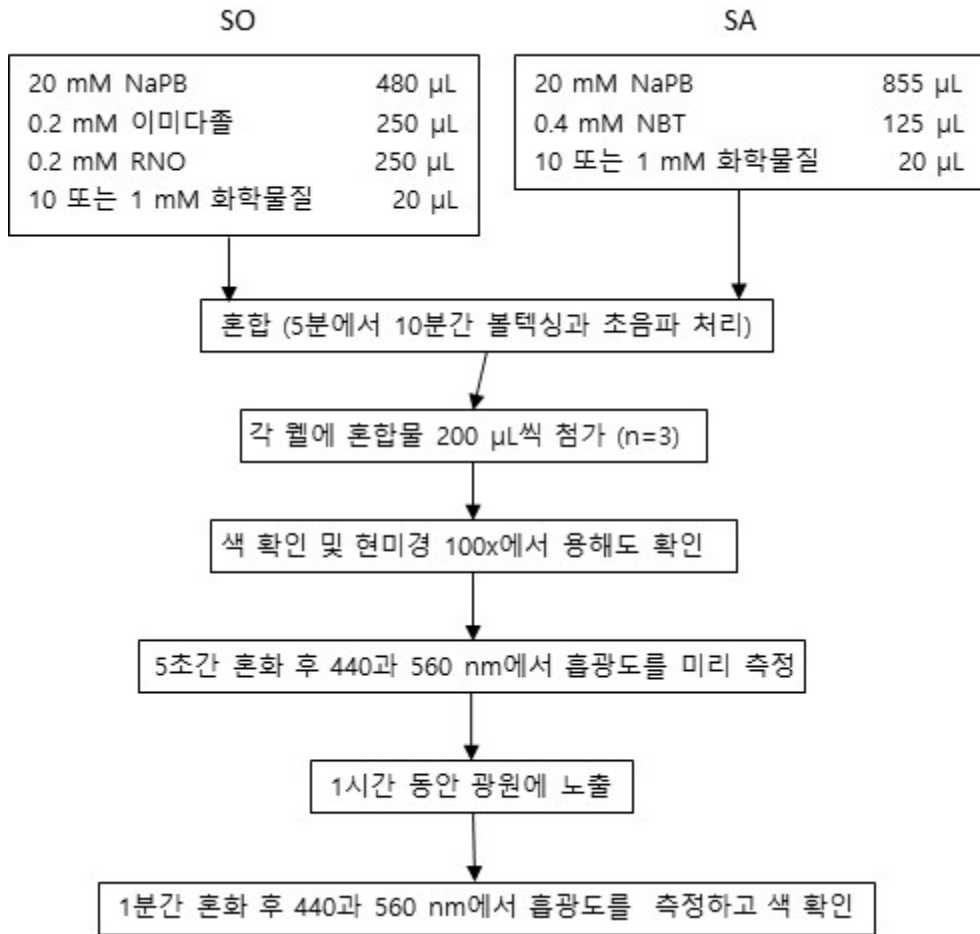


그림 3. 시험물질 저장액을 DMSO로 조제한 경우의 시험방법

3) 20 mM NaPB를 용매로 하여 시험물질의 저장액을 조제한 경우에는 아래의 [그림4]와 같은 시험 순서를 따른다.

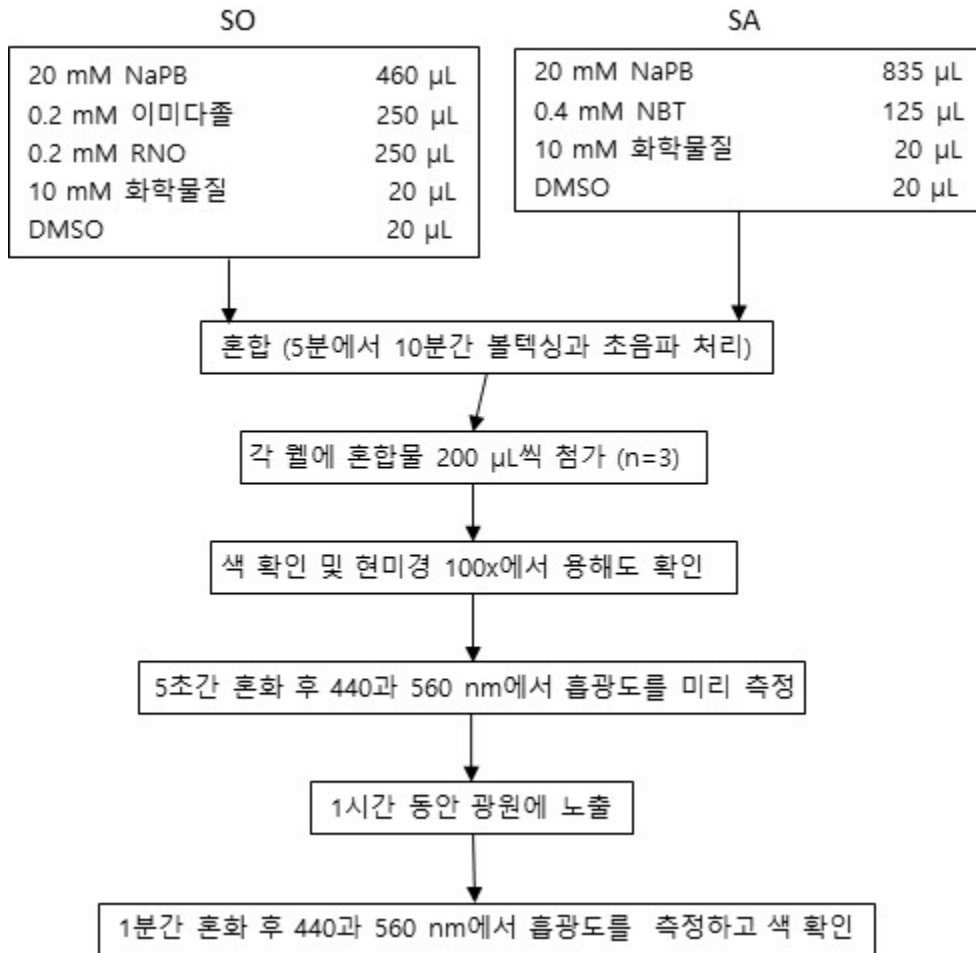


그림 4. 시험물질 저장액을 20 mM NaPB로 조제한 경우의 시험방법

#### 4.8 데이터 분석

각 시험물질 농도에 대한 3개 웰 데이터가 평균 및 표준편차를 계산하는 데 사용된다.

- SO

$$A_{440} \text{의 감소} \times 1000 = [A_{440} (-) - A_{440} (+) - (a - b)] \times 1000$$

$A_{440} (-)$ : 광 조사 전 440 nm에서의 흡광도

$A_{440} (+)$ : 광 조사 후 440 nm에서의 흡광도

a: 광 조사 전 용매 대조군 (평균)

b: 광 조사 후 용매 대조군 (평균)

- SA

$$A_{560} \text{의 증가} \times 1000 = [A_{560} (+) - A_{560} (-) - (b - a)] \times 1000$$

$A_{560} (-)$ : 광 조사 전 560 nm에서의 흡광도

$A_{560} (+)$ : 광 조사 후 560 nm에서의 흡광도

- a: 광 조사 전 용매 대조군 (평균)
- b: 광 조사 후 용매 대조군 (평균)

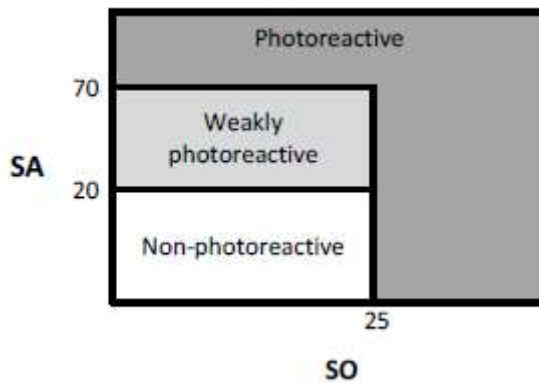
#### 4.9 판단 기준

각 시험물질은 다음과 같이 판단한다.

ROS 분석 예측 모델

판단	농도	SO(3개 웰의 평균)	SA(3개 웰의 평균)
광 반응성	200 μM	≥25	그리고 ≥70
		<25 및/또는 I	그리고 ≥70
		≥25	그리고 <70 및/또는 I
약한 광 반응성	200 μM	<25	그리고 ≥20, <70
광 반응성	20 μM	≥25	그리고 ≥20
광 반응성이 없음	200 μM	<25	그리고 <20
미결정	결과가 위에서 언급된 기준을 충족하지 못함.		

I: 침전 또는 적색과 같은 간섭



#### 4.10 데이터의 품질

규제 목적을 위한 연구는 가능한 한 GLP 규정에 따라 데이터 수집 기록을 보유한 가장 높은 품질 기준으로 수행되어야 하며, 모든 문서는 실험실의 품질 보증 부서 (Quality Assurance Unit)에서 검토되어야 한다.

## V. 인정요건

활성산소종 시험법은 다음의 인정요건을 충족해야 한다.

1. 광 조사 전에 반응 혼합물에서 시험물질의 침전이 없어야 한다.
2. 광 조사 전 후 반응된 혼합물에서 시험물질에 의한 색 간섭이 없어야 한다.
3. 데이터 세트 수집 시 온도 범위(20 - 29 °C) 등의 기술적인 문제가 없어야 한다.
4. 원시 데이터인  $A_{440}$  및  $A_{560}$  값의 범위는 0.02~1.5이다.
5. 평균 $\pm$ 2SD를 기준으로 각 실험실에서 양성 대조군과 음성 대조군 배경 값을 알아야 한다. 검증 데이터에서 얻은 95%의 신뢰 구간(평균 $\pm$ 1.96SD)을 기준으로 다음 범위를 정의했다. 권장 모델 이외의 인공 태양광 조사기를 사용하는 경우 95%의 신뢰 구간으로 기준을 수정한다.
6. 200  $\mu$ M에서 양성 대조군(퀴닌 하이드로클로라이드) 값(3 개 웰의 평균)  
SO: 319~583  
SA: 193~385  
200  $\mu$ M에서 음성 대조군 (솔리소벤존) 값(3 개 웰의 평균)  
SO: -9~11  
SA: -20~2
7. 실험실은 본 시험 가이드라인에 서술된 시험법을 정기적으로 사용하기 전에 부속서 C에 기술된 기술적 숙련도를 입증해야 한다.

## VI. 시험결과 및 보고

시험보고서는 다음의 사항을 포함한다.

### 시험물질

- 시험물질의 식별자료, 일반명, IUPAC, CAS 번호 (알려져 있을 경우)
- 물리적 성상 및 순도

- 시험 수행과 관련된 물리화학적 특성
- 자외/가시부 광선의 흡수스펙트럼 (UV/vis absorption spectrum)
- 안정성, 광안정성 (알려져 있을 경우)

### 대조군

- 이름, 제조업체 및 로트 번호;
- 물리적 성상 및 순도;
- 보관 조건;
- 대조군 용액의 조제;
- 시험에서의 최종 농도

### 용매

- 이름, 제조업체 및 로트 번호;
- 용매 선택 사유
- 용매에 대한 시험물질의 용해도

### 조사 조건

- 사용한 인공 태양광 조사기의 제조사 및 종류;
- 인공 태양광 조사기의 선택에 대한 이론적 근거;
- UVA 검출기 사용;
- UVA 광세기:  $\text{mW}/\text{cm}^2$ 로 표시
- UVA 광량:  $\text{J}/\text{cm}^2$ 로 표시
- 조사 전후의 온도.

### ROS 분석절차

### 적합 및 판단 기준

### 결과

토의

결론



## 별첨 1. 번역본(OECD TG 495)

### 활성산소종을 이용한 광반응성 시험법

### Ros (Reactive Oxygen Species) Assay For Photoreactivity

## 개요

1. 광독성은 전신 또는 국소에 광반응성 물질을 적용시킨 후 자연광 노출에 의해 유발되는 독성반응을 말한다. 여러 종류의 광반응성 물질은 독성이 없는 용량에서도 빛에 의해 활성화되어 광독성 반응을 일으킬 수 있다. 광독성은 광자극(photoirritation), 광알러지(photoallergy) 및 광유전독성(photogenotoxicity)으로 분류할 수 있다(1). 광자극은 광반응성 화학물질에 대해 빛에 의해 유발된 급성 피부 반응이다. 광알러지는 빛이 약물의 구조적 변화를 일으키는 면역반응으로 이러한 약물이 피부의 단백질과 결합하여 합텐(hapten)으로 작용한다(2). 광유전독성은 시험물질에 노출된 후 두 가지 메커니즘으로 발생하는 유전독성 반응으로, DNA의 광들뜸(photoexcitation)으로 인해 직접적으로 발생하거나 광반응성 시험물질의 들뜸(excitation)으로 인해 간접적으로 발생한다.

2. 2002년에 미국 식품의약국(FDA) 및 유럽 의약청(EMA) 규제 기관은 후보 약물의 광안전성 평가 가이드라인을 발표했다(3)(4). 2004년에 OECD는 TG 432(생체외 3T3 Neutral Red Uptake(NRU) 광독성시험법)을 시험물질의 광독성을 평가하는 검증된 방법으로 채택하였다(5). EMA는 또한 2008년에 개요서(concept paper)를 발간하여(6) FDA와 EMA가 권장하는 시험 제안서를 병합하는 시험 전략을 제안하였다. 이러한 문서들을 고려하여 국제의약품규제조화위원회(ICH)는 2014년에 ICH S10 가이드라인인 "의약품의 광안전성 평가"를 발표했다(7).

3. 위에서 언급된 가이드라인에 따라, 시험물질 또는 약물 후보 물질들은 광독성 가능성 여부를 평가해야 한다. 광화학 반응이 일어나기 위해서는 빛이 화합물에 흡수되어야 하기 때문에(8) 시험물질의 광독성 가능성은 화합물의 광화학 특성, 특히 290~700 nm 사이의 빛 흡수 가능성과 관련이 있다. 위 가이드라인에서는 1차 스크리닝으로써 시험물질의 빛 흡수 특성의 평가 필요성을 제안했다(3)(4). ICH S10 가이드라인은 자외/가시광선 흡수 스펙트럼 분석을 약물의 광독성 가능성을 평가하기

위한 기준으로 권장한다(7). 그러나 시험물질의 자외/가시광선 흡수가 항상 광독성 가능성과 직접적으로 연관되는 것은 아니므로 자외선 데이터(몰 흡광계수, MEC)와 다른 적절한 스크리닝 시스템을 조합하는 것이 잘못된 예측을 피하는 것에 장점이 있다.

4. 이전의 지침문서에서 빛의 흡수와 빛에 노출된 조직으로의 분포 외에도 시험물질이 자외/가시광선을 흡수한 후에 활성종의 생성이 직접적인 광독성 반응을 일으키는 주요 요인이 된다고 설명하고 있다(7)(9). 따라서 ICH S10 가이드라인에서는 활성산소종(Reactive Oxygen Species, ROS) 분석(10)(11) 또한 의약품의 광반응성을 평가하기 위한 초기 in chemico 스크리닝 방법으로 포함하였다(7).

5. OECD TG 432는(5) 생체내(in vivo) 광독성시험의 대체법으로서 생체의 3T3 NRU 광독성시험법을 설명하고 광독성 유해성 평가를 위한 구체적인 기준을 정한다. 3T3 NRU 광독성시험법은 빛의 유무에 따른 시험물질에 노출된 세포의 상대적 생존율 감소를 측정함으로써 광-세포독성(photo-cytotoxicity)을 평가한다. 위 시험법으로 확인된 물질들은 전신투여 및 피부 도포, 또는 국소 적용 후 광반응성을 일으킬 가능성이 있다. 3T3 NRU 광독성시험법은 대부분의 광자극성 시험물질을 정확하게 구별하였지만, 광알러지성 시험물질은 거의 절반 가까이 잘못 예측하였다. 그러나 3T3 NRU 광독성시험법은 원래 광알러지 시험물질 예측을 위해 개발된 것이 아니므로(2) 광알러지성 예측에 대해서는 신뢰성이 떨어지는 것으로 보인다. 활성산소종 분석법과 자외/가시 광선의 흡수 스펙트럼 분석과 같은 광화학 분석법으로 시험물질의 광알러지 가능성을 예측할 수 있지만 위양성 예측의 위험은 여전히 존재한다(12).

6. 용어정의는 부록 1에 수록되어 있다.

## **초기 고려사항과 한계점**

7. 광안전성 평가를 시행하기 전에, OECD TG 101(13)에 따라 시험물질의 자외/가시광선 흡수 스펙트럼(UV/vis absorption spectrum)을 결정해야 한다. 데이터 분석에 근거하여 ICH S10 가이드라인에서는 화학물질의 몰 흡광계수가  $1,000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  미만인 경우, 더 이상의 광안전성 시험은 필요하지 않다고 제안하였다(7). 광독성 시험물질 중  $1,000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  미만의 몰 흡광계수를 보인 물질은 거의 없었으며 이런 시험물질들에 대해서는 활성산소종 분석 또는 기타 광안전성 평가를 시행할 필요가 없을 수 있다(9)(14)(15). 광반응성의 한계점에 대해 수집된 데이터는 Henry et al.(16) 및 Bauer et

al.(17)에서 기술되었다. 간접적인 기전에 의한 광독성(예: 유사포르피린증(pseudoporphyria) 또는 포르피린증(porphyrria))은 드물기는 하지만 여전히 발생할 수 있다. 몰 흡광계수 값이  $1000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  이상인 화합물에 대해 약물 개발자가 광반응성 시험을 수행하는 경우, 음성결과는 더 이상의 광안전성 평가가 필요하지 않다는 결정을 뒷받침할 수 있다.

8. 활성산소종 분석의 신뢰성과 상관성이 최근에 서로 다른 두 인공 태양광 조사기를 사용한 다중 실험실 검증 연구(Multi-laboratory validation study)로 평가되었다(18)(19)(20)(21). 두 인공 태양광 조사기 모두에서 양성 대조군인 퀴닌(quinine)에 대한 일 내(intra-day) 및 일 간(inter-day) 정밀도는 90% 이상인 것으로 밝혀졌으며, 데이터는 실험실 간 높은 재현성을 보여주었다(19). 다중 실험실 검증 연구에서 42개의 코드화된 시험물질(23개의 광독성 및 19개의 비광독성 약물/시험물질을 포함)과 2개의 기준물질에 대한 활성산소종 분석은 정해진 기준에 따라 생체외/생체내 광독성 분석과 비교했을 때 위음성 예측을 나타내지 않았다. 42개 시험물질에 대한 활성산소종 분석의 민감도, 개별 특이도, 양성 및 음성 예측값은 각각 100%, 42~82%, 75~92% 및 100%로 측정되었다. 활성산소종 분석은 화학물질의 정성적 광반응성 평가를 위해 설계된 것으로, 인공 태양광에 노출된 시험물질(10)의 I형(전자 혹은 수소의 전달로 형성된 자유 라디칼 종) 및 II형(들뜬 상태의 삼중 감광제에서 산소로의 에너지 전달) 광화학 반응을 관찰하는 원리이다. 여기서 광화학 반응은 광분해 및 광자극성, 광알러지성, 광유전독성을 포함한 다양한 광독성반응으로 이어질 수 있다(10). 또한 이 분석법은 양성 시험물질 검출에 최적화되어 있다. 활성산소종 분석에서 음성이 나온 시험물질은 생체내 시험에서도 음성일 가능성이 높다; 그러나 활성산소종 분석에서 광반응성인 화학물질이 생체내 시험에서 양성인지를 결정하기 위해서는 추가적인 데이터가 필요하다. 본 시험법은 시험물질 대사산물의 영향과 같은 광독성의 간접적 기전을 다루기 위해 개발된 시험법은 아니다.

9. 현재 활성산소종 분석의 적용 가능 영역은 프로토콜에 제시된 용해도 기준을 만족하는 시험물질로 제한된다(단락 22 참고). 반응 혼합물에서 불용성인 시험물질은 본 프로토콜(DMSO 또는 NaPB 용매)을 사용하여 활성산소종을 분석하기에는 적합하지 않으나 반응 혼합물에 용해도 증강 물질을 첨가한다면 시험법 적용이 가능할 수 있다(22)(23)(24). 그러나 일상적으로 시험하기 전에 이러한 용해도 증강 물질이 첨가된 용매는 숙련도 물질로 추가적인 특성화 과정 및 표준화 과정을 거쳐야 한다. 활성산소종 분석에서 과산화물 음이온(superoxide anion, SA)은 니트로블루테트라졸륨(nitroblue tetrazolium)의 환원으로 측정할 수 있으며, 일중항 산소(singlet oxygen, SO)의 양은 이미다졸의 산화로 탈색된(bleaching) p-니트로소디메틸아닐린(p-nitrosodimethylaniline)에 근거하여 측정할 수 있다(11). 이러한 반응을 방해하는 몇몇 시험물질은 때때로

활성산소종 분석의 적용 가능 영역에 포함되지 않는 것으로 여겨진다. 예를 들어, 아스코르빈산 및 다른 환원성 시험물질은 테트라졸륨염을 포르마잔으로 직접 환원시킨다(25). 일부 피부 미백 화장품도 활성산소종의 측정을 방해하는 강력한 환원성을 가진다. 아스코르빈산은 또한 이미다졸 유도체의 산화를 촉진하여 활성산소종 분석법에서 위양성을 나타낸다(26).

10. "시험물질"은 본 시험 가이드라인에서 시험 대상을 지칭하기 위한 용어로 사용되며, 활성산소종 분석법에서 단일성분물질, 다성분물질 및/또는 혼합물에 대한 적용 가능성과는 관련이 없다. 현재까지 알려진 데이터에 근거하여 활성산소종 분석법은 다양한 유기 작용기, 반응기전, 광독성 정도(potency)(생체내 연구에서 결정됨) 및 물리화학적 특성을 가진 시험물질들에 걸쳐 적용 가능한 것으로 나타났다. 현재 다성분물질/혼합물에 대한 활성산소종 분석법의 적용 가능성에 대한 정보는 제한적이다(27). 혼합물, 시험하기 어려운 물질(예: 불안정한 물질)이나 본 가이드라인의 적용 가능 영역에 명확하게 속하지 않는 시험물질을 분석하고자 하는 경우 과학적으로 의미 있는 시험결과를 얻을 수 있는지 사전에 고려해야 한다.

## 시험의 원리

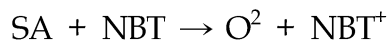
11. 화학물질의 광독성은 자연광 노출과 함께 물질이 전신 또는 국소에 적용되어 유발될 수 있다. 여러 종류의 화학물질은 그 자체로는 독성이 없지만 자연광 노출에 의해 피부나 눈에서 반응성이 나타나 독성이 유발될 수 있다. 모든 광독성 반응에서 초기 단계는 발색단(chromophore)의 들뜸(excitation)을 유도하는 파장의 광자를 흡수하는 것이다. 들뜸 에너지(excitation energy)는 종종 산소 분자로 전달된 후 활성산소종의 생성으로 이어지는데, 광들뜸 분자들(photo-excited molecules)에 의한 I형 광화학 반응(type I photochemical reaction)을 통한 SA의 생성 및 II형 광화학 반응(type II photochemical reaction)을 통한 SO의 생성을 포함한다. 이들은 많은 광독성 반응에 있어서 주요한 중간체 종들(species)로 보여진다. 세포 성분과 함께 들뜸 발색단의 직접적인 반응 또한 광독성을 유발할 수 있다. 그러므로 활성산소종 분석으로 모든 광독성의 궁극적인 기전을 확인할 수는 없지만 인공 태양광이 조사된 시험물질에서 생성된 활성산소종의 측정은 광독성 가능성을 나타낸다.

12. 활성산소종 분석에서는 440 nm에서 p-니트로소디메틸아닐린(RNO) 탈색의 분광광도식 측정과 RNO의 흡광도 감소를 통해 SO의 생성을 검출한다(28). SO는 RNO와 화학적으로 반응하지는 않지만 SO는 이미다졸 고리(imidazole ring)에 포집되어 RNO의

탈색을 유도할 수 있는 트랜스 고리형(trans-annular) 과산화물 중간체를 생성한다:



13. SA의 생성은 니트로블루테트라졸륨(NBT)의 환원을 통해 측정한다. 아래와 같이 NBT는 SA에 의해 1개 전자 전달 반응을 거쳐 환원될 수 있으며, 안정적인 중간체로서 부분적으로 환원된(2e-) 모노포르마잔(NBT<sup>+</sup>)을 생성한다(29). 따라서 SA는 NBT를 NBT<sup>+</sup>로 환원시킬 수 있으며 이는 분광광도계로 560 nm에서 측정할 수 있다.



### 속련도 입증

14. 본 시험 가이드라인에 서술된 시험법을 일상적으로 사용하기 전에 실험실은 부록 3에 제시된 속련도 물질을 사용하여 기술적 속련도를 입증해야 한다. 권장되는 두 인공 태양광 조사기(Suntest CPS+ 또는 CPS와 SXL-2500V2)를 사용하는 경우에는 9개의 속련도 물질(Nos. 1 - 9) 또는 권장 모델 이외의 인공 태양광 조사기를 사용하는 경우에는 17개의 속련도 물질(Nos. 1-17)로 시험해야 하며, 모든 속련도 물질에 대한 SO 및 SA 측정값은 반드시 부록 3에 서술된 범위 안에 있어야 한다.

## 시험방법

### 인공 태양광 조사기

15. 일반적으로 교정된 인공 태양광 조사기가 사용되는데, 그 이유는 지구상의 위치와 시간대에 따른 스펙트럼 차이에 의해 자연 태양광으로 유발된 광반응성이 이 분석의 관심이기 때문이다. 인공광(artificial light)으로 유발된 광반응성이 관심이라면, 다른 광원을 고려할 수 있다. UV 및 가시광선 조사를 위해서는 적절한 인공 태양광 조사기를 사용해야 한다. 조사 출력 배분은 UVC 파장을 줄이는 적절한 필터를 사용하여 가능한 한 실외 일광과 가깝게 유지해야 한다. 권장되는 시험 조건은 다음과 같다:

- 290 nm 미만의 UV 파장을 줄이는 필터가 장착된 인공 태양광 조사기(부록 2 참조)
  - 1시간 동안 1.8~2.2 mW/cm<sup>2</sup> (예: CPS+의 경우 표시기 설정 값 250 W/m<sup>2</sup>),
  - 6.5~7.9 J/cm<sup>2</sup>의 UVA 세기 (부록 2)

- UV 필터(300 nm 미만의 파장을 줄이는)가 장착된 SXL-2500V2(Seric)
  - 1시간 동안 3.0~5.0 mW/cm<sup>2</sup>
  - 11~18 J/cm<sup>2</sup>의 UVA 세기 (부록 2).

16. 활성산소종의 생성은 온도의 영향을 받기 때문에 인공 태양광 조사기는 조사(irradiation) 중의 온도를 안정화시키기 위한 적절한 온도 제어 장치 또는 팬이 장착되어 있어야 한다. 인공 태양광 조사기의 표준 온도는 25 °C이다. 조사(irradiation) 중 허용되는 온도 범위는 20~29°C이다(20)(21).

### 쿼츠 반응 용기(Quartz reaction container)

17. UV가 플라스틱 뚜껑을 통과하며 일어나는 손실과 반응 혼합물의 기화를 막기 위해 쿼츠 반응 용기가 사용된다(20)(21)(30). 권장 용기에 대한 사양은 부록 4에 제공되어 있다. 다른 용기를 사용하는 경우 UV 투과율이 높은 뚜껑 또는 밀봉 물질(seal)을 사용해야 한다. 이 경우 UV 및 가시광선의 노출에 대한 걱정 수준을 결정하기 위해 표준물질(No. 1 - 17)을 사용한 타당성 시험(feasibility study)을 수행해야 한다.

### 시약

18. 모든 시약은 조제 후 1개월 이내에 사용해야 하며 사용 직전 초음파 처리를 해야 한다 (20)(21). 대표적인 조제 방법은 다음과 같다.

- 20 mM 인산나트륨 완충액 (NaPB), pH 7.4
  - 593 mg의 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O (CAS No. 13472-35-0) 및 5.8 g의 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O (CAS No. 10039-32-4), 900 mL의 정제수를 첨가하고, HCl을 사용하여 pH를 7.4로 맞춘 후 정제수로 1 L를 맞추어 희석하고 혼합한다.
  - 냉장 보관 혹은 실온 보관한다.
- 0.2 mM p-니트로소디메틸아닐린 (RNO, CAS No. 138-89-6)
  - 100 mL의 20 mM NaPB에 3 mg의 RNO를 녹인다.
  - 냉장 보관 및 차광한다.
- 0.2 mM 이미다졸 (CAS No. 288-32-4)
  - 10 mL의 20 mM NaPB에 13.6 mg의 이미다졸을 녹인다.
  - 20mM 이미다졸 용액을 20 mM NaPB로 100배 희석한다.
  - 냉장 보관 및 차광한다.
- 0.4 mM 염화 니트로블루테트라졸륨 (NBT, CAS No. 298-83-9)
  - 100 mL의 20 mM NaPB에 32.7 mg의 NBT를 녹인다.

- 냉장 보관 및 차광한다.

## 용매

19. 처음에는 분석용(analytical grade) DMSO를 사용한다. DMSO에 용해되지 않는 시험물질의 경우 20 mM NaPB를 용매로 사용해야 한다. 일부 시험물질은 DMSO와 반응하므로 DMSO에서 시험물질의 안정성을 확인해야 한다. 시험물질이 DMSO 또는 NaPB에서 용해되지 않거나 안정적이지 않으면, 다른 용매가 사용될 수 있다. 그러나 선택된 용매에서 시험물질의 안정성이 증명되어야 하며 숙련도 물질에 대한 SO 및 SA 범위는 부록 3에 정의된 범위 내에 있어야 한다.

## 시험물질

20. 보관 조건에서 안정성을 입증할 수 있는 자료가 없는 한, 시험물질은 사용 직전에 새로 조제하여야 한다. 모든 시험물질 취급과 처음 세포를 처리하는 경우는 UV 조사 전에 시험물질이 분해되거나 광 활성화되는 것을 피하는 조명 조건 하에서 수행해야 한다. 시험물질의 최종 농도는 200  $\mu$ M가 되어야 한다. 200  $\mu$ M의 반응 혼합물에서 광 조사 전 침전이 발생하거나 착색 또는 기타 간섭이 일어나는 경우 20  $\mu$ M 농도를 사용할 수 있다. 20  $\mu$ M에서의 양성 결과는 광반응성을 나타내는 것으로 사용할 수 있다; 그러나 낮은 농도인 20  $\mu$ M 에서의 음성 결과는 광반응성이 없는 것을 의미하지 않는다. 시험물질의 분자량은 반드시 제공되어야 한다.

21. 시험용액은 단락 19에 서술된 바와 같이 사용하기 직전에 용매에 녹인다. 각각의 시험물질을 튜브에 넣고 무게를 측정하고 용매를 첨가하여 10 mM 농도로 만든다(20) 21). 튜브를 볼텍스믹서로 혼합하고 5분에서 10분간 초음파 처리를 한다. 모든 조제 과정 중에는 강한 UV 및 강한 가시광선(예: 직사광선, 자연광에 노출된 창문 근처에서 조제)을 차단해야 한다. 200  $\mu$ M의 반응 혼합물에서 조사 전에 침전이 관찰되거나 다른 간섭이 관찰된다면 DMSO로 시험물질 stock 용액 10 mM을 희석하여 1 mM 용액(최종 농도로서 20  $\mu$ M)을 조제해야 한다. DMSO에 용해되지 않는 시험물질의 경우 반응 혼합물에 20  $\mu$ L의 DMSO(2 v/v%)를 첨가해야 한다.

## 양성 대조군과 음성 대조군

22. 퀴닌 하이드로클로라이드 (양성 대조군, CAS No. 6119-47-7)와 솔리소벤존 (음성 대조군, CAS No. 4065-45-6)의 stock 용액은 위 절차에 따라 DMSO를 사용하여 각각 10 mM (최종 농도 200  $\mu$ M)로 조제해야 하며, 튜브에 나눠 담아 최대 1개월 간

냉동보관(일반적으로 -20℃ 미만) 한다. Stock 용액은 실험 직전에 해동하여 하루 안에 사용해야 한다.

### 시험방법

23. 일반적인 96-웰 플레이트의 배열은 다음과 같고, 다른 배열도 허용된다.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A					Singlet oxygen								
B		B	P	N	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7		
C		B	P	N	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7		
D		B	P	N	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7		
E		B	P	N	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7		
F		B	P	N	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7		
G		B	P	N	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7		
H					Superoxide anion								

B: Blank  
 P: Positive control(Quinine)  
 N: Negative control(Sulisobenzone)  
 T1-T7: Test chemical No. 1-7

그림 1. 플레이트 배열의 일반적인 예

24 튜브(예: 1.5 mL 마이크로튜브)와 투명하고 편평한 바닥(flat bottomed)의 플라스틱으로 된 96-웰 마이크로플레이트를 사용해야 한다. 반응 혼합물은 UV-차단 조명 혹은 차양(shade) 하에서 볼텍스 혼합(vortex mixing) 및/또는 초음파 처리에 의해 조제되어야 한다. 동일한 부피(20 µL)의 DMSO를 시험물질 용액 대신 용매 대조군(vehicle control)에 첨가해야 한다.



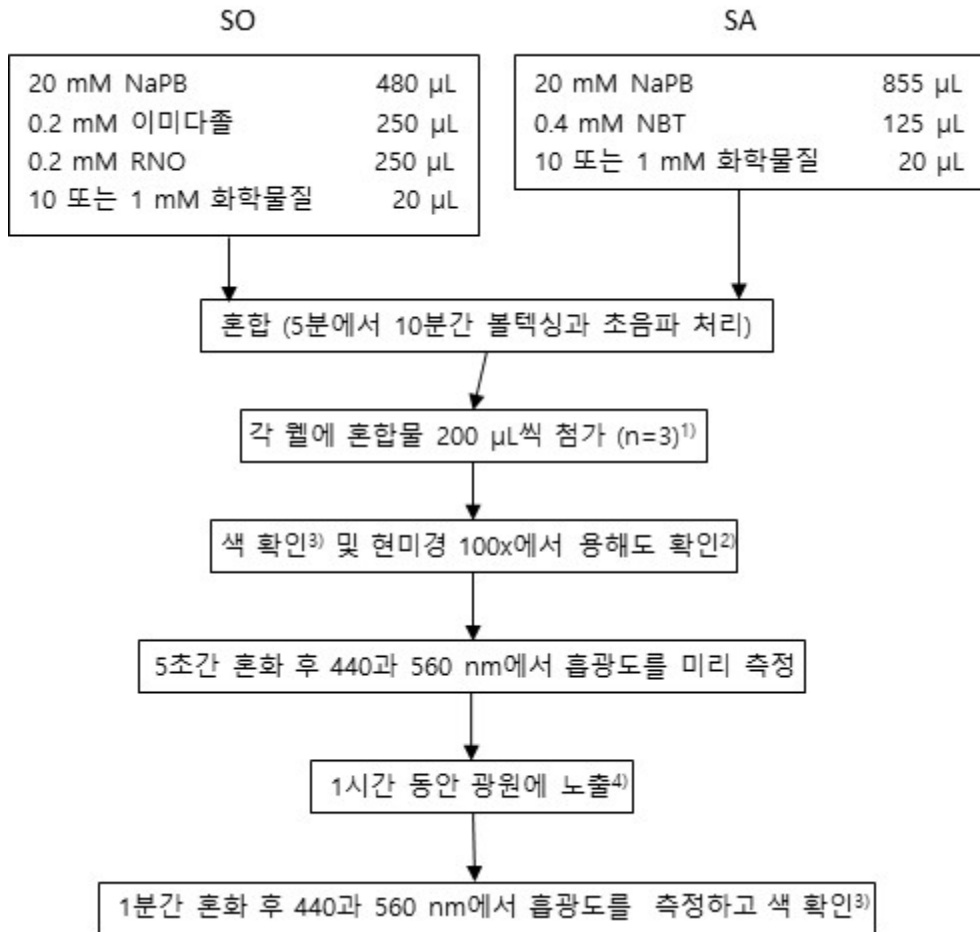


그림 2. 시험물질 stock 용액을 DMSO로 조제한 경우의 작업 흐름도

1) 가장자리의 웰은 사용하지 않는다. 한 플레이트에서 두 개 이상의 시험물질을 시험할 수 있다.

2) 일부 시험물질은 반응 혼합물에서 침전될 수 있으므로 광원 조사 전에 용해도를 확인해야 한다. 조사 전 각 반응 혼합물 웰에서의 용해도를 현미경으로 관찰해야 한다. 침전된 혹은 혼탁한 용액이 되지 않도록 시험물질 농도를 설정해야 한다.

3) 육안으로 반응 혼합물의 착색을 확인해야 한다.

4) 96-웰 플레이트를 쿼츠 반응 용기(quartz reaction container)에 넣는다. 플레이트에 쿼츠 덮개를 설치하고 볼트로 고정해야한다. 인공 태양광 조사기를 사용할 때는 온도 및 기타 주변 조건이 안정적인지 확인해야 한다. 조사 전후에 플레이트에서 UVA 검출기 및 온도계를 사용하여 UVA 강도 및 온도를 측정한다.

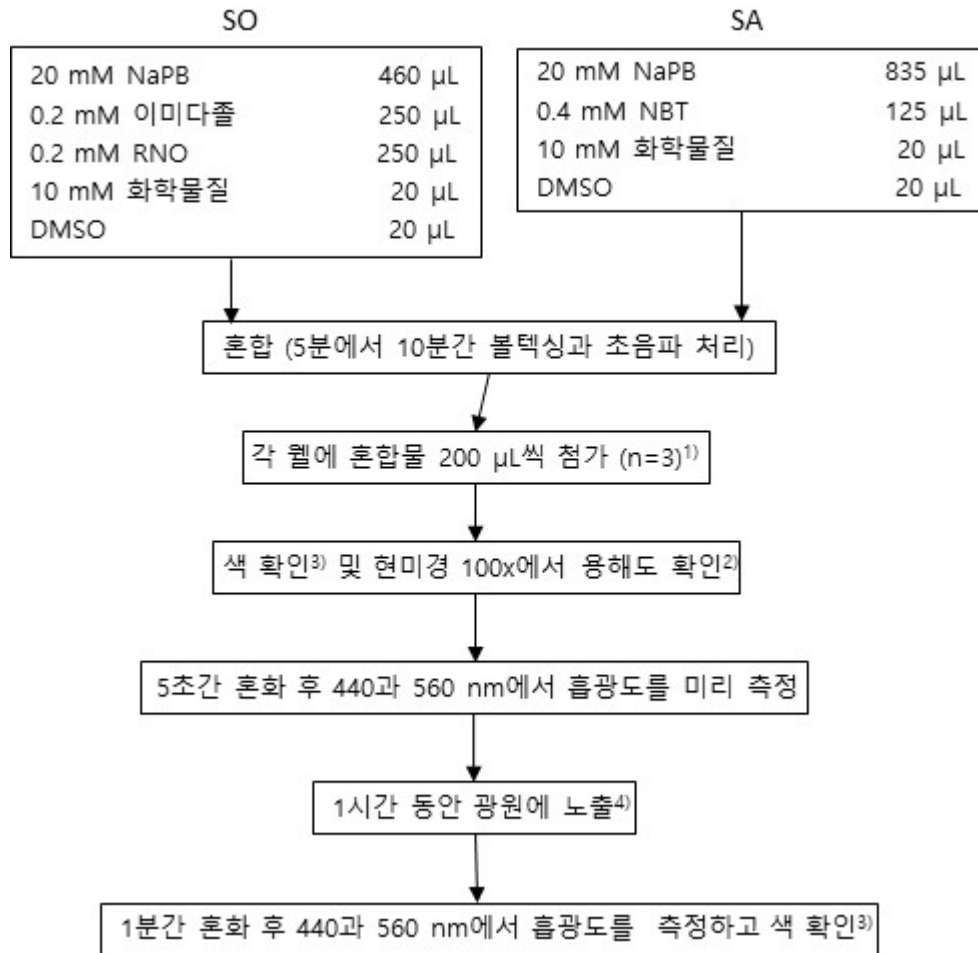


그림 3. 시험물질 stock 용액을 20 mM NaPB로 조제한 경우의 작업 흐름도

1) 가장자리의 웰은 사용하지 않는다. 한 플레이트에서 두 개 이상의 시험물질을 시험할 수 있다.

2) 일부 시험물질은 반응 혼합물에서 침전될 수 있으므로 광원 조사 전에 용해도를 확인해야 한다. 조사 전 각 반응 혼합물의 웰에서의 용해도를 현미경으로 관찰해야 한다. 침전된 혹은 혼탁한 용액이 되지 않도록 시험물질 농도를 설정해야 한다.

3) 육안으로 반응 혼합물의 착색을 확인해야 한다.

4) 96-웰 플레이트를 쿼츠 반응 용기(quartz reaction container)에 넣는다. 플레이트에 쿼츠 덮개를 설치하고 볼트로 고정해야 한다. 인공 태양광 조사기를 사용할 때는 온도 및 기타 주변 조건이 안정적인지 확인해야 한다. 조사 전후에 플레이트에서 UVA 검출기 및 온도계를 사용하여 UVA 강도 및 온도를 측정한다.

## 시험자료 및 보고

### 데이터 분석

25. 각 시험물질 농도에 대한 3개 웰 데이터가 평균 및 표준편차를 계산하는 데 사용된다.

#### SO

$$A_{440} \text{의 감소} \times 1000 = [A_{440} (-) - A_{440} (+) - (a - b)] \times 1000$$

$A_{440} (-)$ : 광 조사 전 440 nm에서의 흡광도

$A_{440} (+)$ : 광 조사 후 440 nm에서의 흡광도

a: 광 조사 전 용매 대조군 (평균)

b: 광 조사 후 용매 대조군 (평균)

#### SA

$$A_{560} \text{의 증가} \times 1000 = [A_{560} (+) - A_{560} (-) - (b - a)] \times 1000$$

$A_{560} (-)$ : 광 조사 전 560 nm에서의 흡광도

$A_{560} (+)$ : 광 조사 후 560 nm에서의 흡광도

a: 광 조사 전 용매 대조군 (평균)

b: 광 조사 후 용매 대조군 (평균)

### 데이터의 인정요건

26. 각 실험에서는 다음의 기준을 충족해야 한다.

- 광 조사 전에 반응 혼합물에서 시험물질의 침전이 없음.
- 광 조사 전 후 반응 혼합물에서 시험물질에 의한 색 간섭이 없음.
- 데이터 세트 수집 시 온도 범위(20 - 29 °C) 등의 기술적인 문제가 없음.
- 원 데이터인  $A_{440}$  및  $A_{560}$  값의 범위는 0.02-1.5.
- 평균 $\pm$ 2SD를 기준으로 각 실험실에서 양성 대조군과 음성 대조군 배경 값을 알아야 한다. 검증 데이터에서 얻은 95%의 신뢰 구간(평균 $\pm$ 1.96SD)을 기준으로 다음 범위를 정의했다. 권장 모델 이외의 인공 태양광 조사기를 사용하는 경우 95%의 신뢰 구간을 기준으로 변경된 기준을 설정한다.
- 200  $\mu$ M에서 양성 대조군 (퀴닌 하이드로클로라이드) 값 (3개 웰의 평균)
  - SO: 319~583
  - SA: 193~385
- 200  $\mu$ M에서 음성 대조군 (솔리소벤존) 값 (3개 웰의 평균)
  - SO: -9~11
  - SA: -20~2

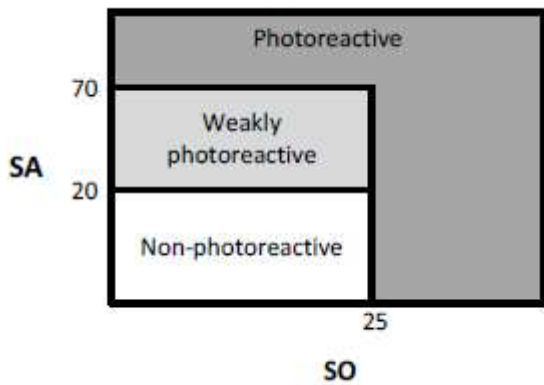
- 실험실은 본 시험 가이드라인에 서술된 시험법을 일상적으로 사용하기 전에 부속서 C에 기술된 기술적 숙련도를 입증해야 한다.

## 판단 기준

27. 각 시험물질은 다음과 같이 판단한다.

### ROS 분석 예측 모델

판단 <sup>1)2)</sup>	농도 <sup>3)</sup>	SO (3개 월의 평균) <sup>4)</sup>	SA (3개 월의 평균) <sup>4)</sup>
광반응성	200 $\mu$ M	$\geq 25$	그리고 $\geq 70$
		$< 25$ 및/또는 $I^5)$	그리고 $\geq 70$
		$\geq 25$	$< 70$ 및/또는 $I^5)$
약한 광반응성	200 $\mu$ M	$< 25$	그리고 $\geq 20, < 70$
광반응성	20 $\mu$ M	$\geq 25$	그리고 $\geq 20$
광반응성이 없음	200 $\mu$ M	$< 25$	그리고 $< 20$
미결정	결과가 위에서 언급된 기준을 충족하지 못함 <sup>6)</sup>		



- 1) 활성산소종 분석은 검증 연구에서 실험실 내 및 실험실 간 재현성이 우수하기 때문에 단일 실험으로 결과를 판단하기 충분하다.
- 2) 20과 200  $\mu$ M에서 침전, 착색 또는 기타 간섭이 관찰되면 그 화학물질은 활성산소종 분석과 호환되지 않는 것으로 간주되어 미결정으로 판단된다.
- 3) 20  $\mu$ M은 200  $\mu$ M에서 침전 또는 착색이 관찰될 때 사용할 수 있다. 20  $\mu$ M에서의 양성 결과는 광 반응성을 의미한다; 그러나 20  $\mu$ M보다 낮은 농도에서의 음성 결과로는 광 반응성이 없다고 할 수 없다.
- 4) 출판된 원고에 정의된 분류 기준. (11)(20)(21)
- 5) 침전 또는 착색과 같은 간섭.
- 6) 양성 예측은 SO만, SA만 또는 둘 다에 기반하여 이루어질 수 있다. 그러나 신뢰할 수 있는 음성 예측을 위해서는 SO 와 SA 값을 모두 얻어야 한다.

## 데이터의 품질

28. 규제 목적을 위한 연구는 가능한 한 GLP 규정에 따라 데이터 수집 기록을 보유한 상태에서 최상의 품질 기준으로 수행되어야 하며, 모든 문서는 실험실의 품질 보증 부서(Quality Assurance Unit)에서 검토되어야 한다.

## 시험 보고서

29. 시험 보고서에는 다음과 같은 정보를 포함해야 한다.

### 시험물질:

- 시험물질의 식별자료, 일반명, IUPAC, CAS 번호 (알려져 있을 경우)
- 물리적 성상 및 순도
- 시험 수행과 관련된 물리화학적 특성
- 자외/가시부 광선의 흡수스펙트럼 (UV/vis absorption spectrum)
- 안정성, 광안정성 (알려져 있을 경우)

### 대조군 물질:

- 이름, 제조업체 및 로트 번호;
- 물리적 성상 및 순도;
- 보관 조건;
- 대조군 용액의 조제;
- 시험된 최종 농도

### 용매:

- 이름, 제조업체 및 로트 번호;
- 용매 선택 사유
- 용매에 대한 시험물질의 용해도

### 조사 조건:

- 사용한 인공 태양광 조사기의 제조사 및 종류;
- 인공 태양광 조사기 선택에 대한 이론적 근거;
- 사용한 UVA 검출기;
- UVA 광세기:  $\text{mW}/\text{cm}^2$ 로 표시
- UVA 광량:  $\text{J}/\text{cm}^2$ 로 표시
- 조사 전후의 온도.

ROS 분석 절차

적합 및 판단 기준

결과

토의

결론

## 참고문헌

- (1) Moore, D. E. (2002). Drug-induced cutaneous photosensitivity: incidence, mechanism, prevention and management. *Drug Saf*, 25, 345-72
- (2) Onoue, S., Seto, Y., Sato, H., Nishida, H., Hirota, M., Ashikaga, T., Api, A. M., Basketter, D. and Tokura, Y. (2017). Chemical photoallergy: photobiochemical mechanisms, classification, and risk assessments. *J Dermatol Sci*, 85, 4-11
- (3) The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Evaluation of Medicines for Human Use, Committee for Proprietary Medicinal Products (EMA/CPMP) (2002). Note for Guidance on Photosafety Testing, CPMP/SWP/398/01.
- (4) The Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (FDA/CDER) (2002). Guidance for Industry, Photosafety Testing.
- (5) The Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) (2004). OECD guideline for testing of chemicals, 432, In vitro 3T3 NRU phototoxicity test.
- (6) The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Evaluation of Medicines for Human Use, Committee for Proprietary Medicinal Products (EMA/CPMP) (2008). Concept Paper on the Need for Revision of the Note for Guidance on Photosafety testing, CPMP/SWP/398/01.
- (7) International Council on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) (2014). ICH guideline S10 Guidance on photosafety evaluation of pharmaceuticals.
- (8) Radiation. Encyclopedia Britannica Online. Retrieved 2009-11-09.
- (9) The Organisation for Economic Co-operation and Development (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.
- (10) Onoue, S. and Tsuda, Y. (2006). Analytical studies on the prediction of photosensitive/phototoxic potential of pharmaceutical substances. *Pharm Res*, 23, 156-64
- (11) Onoue, S., Kawamura, K., Igarashi, N., Zhou, Y., Fujikawa, M., Yamada, H., Tsuda, Y., Seto, Y. and Yamada, S. (2008). Reactive oxygen species assay-based risk assessment of drug-induced phototoxicity: classification criteria and application to drug candidates. *J Pharm Biomed Anal*, 47, 967-72
- (12) Onoue, S., Ohtake, H., Suzuki, G., Seto, Y., Nishida, H., Hirota, M., Ashikaga, T. and Kouzuki, H. (2016). Comparative study on prediction performance of photosafety testing tools on photoallergens. *Toxicol In Vitro*, 33, 147-52
- (13) The Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) (1981). OECD guideline for testing of chemicals, 101, UV-VIS absorption spectra.
- (14) Onoue, S., Suzuki, G., Kato, M., Hirota, M., Nishida, H., Kitagaki, M., Kouzuki, H. and Yamada, S. (2013). Non-animal photosafety assessment approaches for cosmetics based on the photochemical and photobiochemical properties. *Toxicol In Vitro*, 27, 2316-24
- (15) Lovell, W. W. (1993). A scheme for in vitro screening of substances for

- photoallergenic potential. *Toxicol In Vitro*, 7, 95-102
- (16) Henry, B., Foti, C. and Alsante, K. (2009). Can light absorption and photostability data be used to assess the photosafety risks in patients for a new drug molecule? *J Photochem Photobiol B*, 96, 57-62
- (17) Bauer, D., Averett, L. A., De Smedt, A., Kleinman, M. H., Muster, W., Pettersen, B. A. and Robles, C. (2014). Standardized UV-vis spectra as the foundation for a threshold-based, integrated photosafety evaluation. *Regul Toxicol Pharmacol*, 68, 70-5
- (18) Onoue, S., Hosoi, K., Wakuri, S., Iwase, Y., Yamamoto, T., Matsuoka, N., Nakamura, K., Toda, T., Takagi, H., Osaki, N., Matsumoto, Y., Kawakami, S., Seto, Y., Kato, M., Yamada, S., Ohno, Y. and Kojima, H. (2013). Establishment and intra-/inter-laboratory validation of a standard protocol of reactive oxygen species assay for chemical photosafety evaluation. *J Appl Toxicol*, 33, 1241-1250
- (19) Onoue, S., Hosoi, K., Toda, T., Takagi, H., Osaki, N., Matsumoto, Y., Kawakami, S., Wakuri, S., Iwase, Y., Yamamoto, T., Nakamura, K., Ohno, Y. and Kojima, H. (2014). Intra-/inter-laboratory validation study on reactive oxygen species assay for chemical photosafety evaluation using two different solar simulators. *Toxicol In Vitro*, 28, 515-23
- (20) ROS assay validation management team (2013). Validation report for the international validation study on ROS (Reactive Oxygen Species) assay as a test evaluating phototoxic potential of chemicals (Atlas Suntest version), [http://www.jacvam.jp/files/news/ROS\\_Assay\\_full%2020130920%20atlas\\_fourth%20data.pdf](http://www.jacvam.jp/files/news/ROS_Assay_full%2020130920%20atlas_fourth%20data.pdf) (accessed May, 2015).
- (21) ROS assay validation management team (2013). Validation report for the international validation study on ROS (Reactive Oxygen Species) assay as a test evaluating phototoxic potential of chemicals (Seric version), [http://www.jacvam.jp/files/news/ROS\\_Assay\\_full%2020131009Seric%20fourth.pdf](http://www.jacvam.jp/files/news/ROS_Assay_full%2020131009Seric%20fourth.pdf) (accessed May, 2015).
- (22) Onoue, S., Yamauchi, Y., Kojima, T., Igarashi, N. and Tsuda, Y. (2008). Analytical studies on photochemical behavior of phototoxic substances; effect of detergent additives on singlet oxygen generation. *Pharm Res*, 25, 861-8
- (23) Seto, Y., Kato, M., Yamada, S. and Onoue, S. (2013). Development of micellar reactive oxygen species assay for photosafety evaluation of poorly water-soluble chemicals. *Toxicol In Vitro*, 27, 1838-46
- (24) Onoue, S., Kato, M. and Yamada, S. (2014). Development of an albuminous reactive oxygen species assay for photosafety evaluation under experimental biomimetic conditions. *J Appl Toxicol*, 34, 158-65
- (25) Bruggisser, R., von Daeniken, K., Jundt, G., Schaffner, W. and Tullberg-Reinert, H. (2002). Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. *Planta Med*, 68, 445-8
- (26) Imanaga, Y. (1955). Autooxidation of L-ascorbic acid and imidazole nucleus. *J Biochem*, 42, 657-67
- (27) Nishida, H., Hirota, M., Seto, Y., Suzuki, G., Kato, M., Kitagaki, M., Sugiyama, M., Kouzuki, H. and Onoue, S. (2015). Non-animal photosafety screening for complex cosmetic ingredients with photochemical and photobiochemical assessment tools. *Regul Toxicol Pharmacol*, 72, 578-85



- (28) Kraljic, I. and Mohsni, S. E. (1978). A new method for the detection of singlet oxygen in aqueous solutions. *Photochem Photobiol*, 28, 577-81
- (29) Pathak, M. A. and Joshi, P. C. (1984). Production of active oxygen species ( $^1O^2$  and  $O^{2\cdot}$ ) by psoralens and ultraviolet radiation (320-400 nm). *Biochim Biophys Acta*, 798, 115-26
- (30) Onoue, S., Igarashi, N., Yamada, S. and Tsuda, Y. (2008). High-throughput reactive oxygen species (ROS) assay: an enabling technology for screening the phototoxic potential of pharmaceutical substances. *J Pharm Biomed Anal*, 46, 187-93

## 부록 1 - 용어정의

**3T3 NRU 광독성 시험(3T3 NRU Phototoxicity Test):** 생체외 3T3 neutral red 흡수 광독성 시험

**광세기(복사 조도, Irradiance):** 자외선(UV)이나 가시광선이 표면에 작용하는 세기 ( $W/m^2$  또는  $mW/cm^2$ )

**광량(Dose of light):** 자외선(UV) 또는 가시광선이 표면에 작용하는 양(광세기 x 시간)으로 표면적 당 Joules ( $W \times s$ ) 로 표현됨 (예,  $J/m^2$  or  $J/cm^2$ ).

**몰 흡광계수(Molar Extinction Coefficient, MEC):** 몰 흡광계수(몰 흡광도라고도 함)는 특정 조건(예: 용매, 온도 및 파장)에 있는 분자의 상수이며 그 분자가 얼마나 광자를 흡수하는지에 대한 효과를 반영함 (주로  $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ 로 표시)

**광반응성(photoreactivity):** 광자 흡수로 인해 다른 분자와 반응하는 화학물질의 성질

**광독성(Phototoxicity):** 화학물질이 피부에 적용되거나 전신투여 된 후 피부가 빛에 노출되었을 때 나타나는 급성 독성 반응

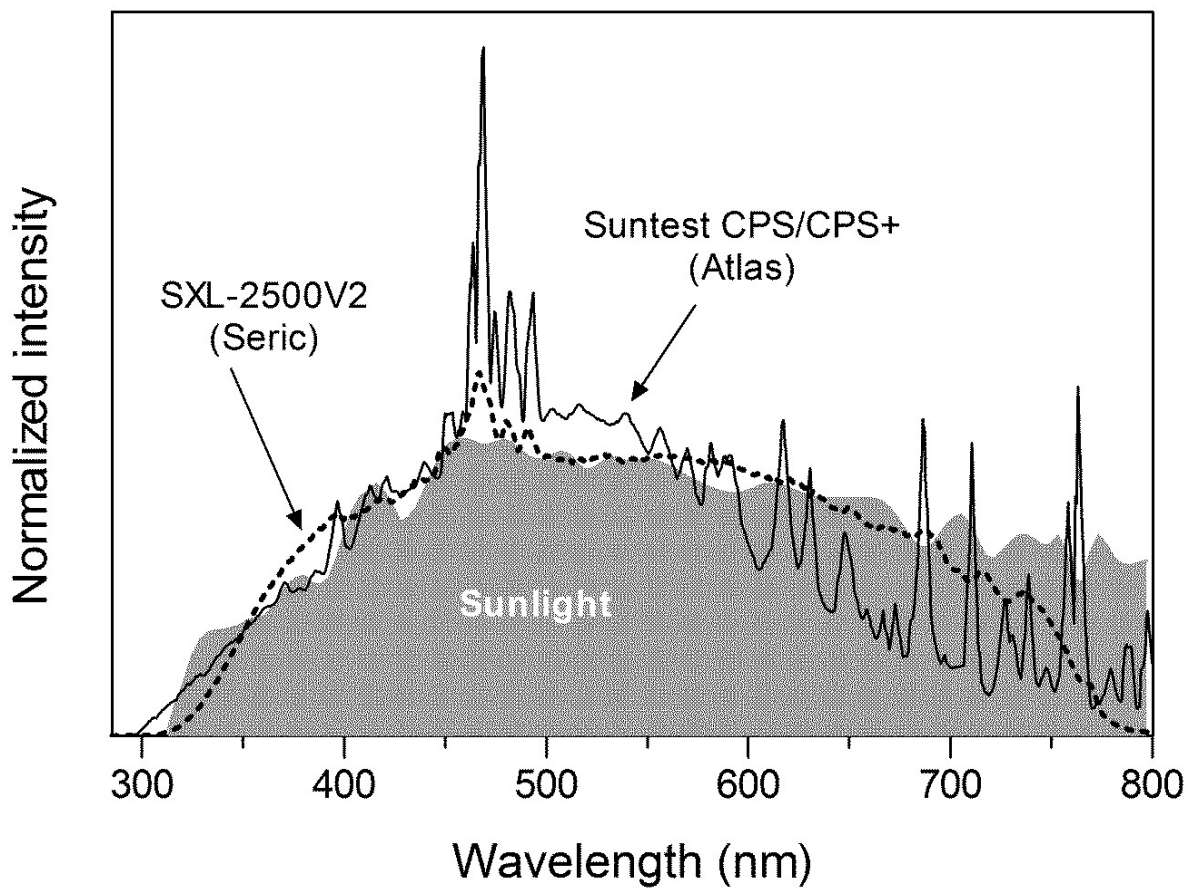
**활성산소종(reactive oxygen species, ROS):** 과산화물 음이온(SA) 및 일중항산소(SO)를 포함한 반응성 산소종

**과산화물 음이온 (Superoxide anion, SA):** I형 광화학 반응을 통해 광 조사된 시험물질로부터 생성된 라디칼 중 중 하나

**일중항산소 (Singlet oxygen, SO):** II형 광화학 반응을 통해 광 조사된 시험물질로부터 생성된 라디칼 중 중 하나

**자외선 파장대(UV light wavebands):** CIE(commission internationale de L'Eclairage) 권고에 따라 UVA(315-400 nm), UVB(280-315 nm), UVC (100-280 nm)로 구분함. UVA와 UVB를 320 nm에서 구분하기도 하고 UVA를 340 nm에서 UVA1과 UVA2로 나눌 수도 있음.

부록 2 - 검증 연구에서 사용한 인공 태양광 조사기의 스펙트럼



### 부록 3. 숙련도 물질

이 시험 가이드라인에 설명된 시험법을 일상적으로 사용하기 전에 실험실은 표에 수록된 숙련도 물질에 대한 활성산소종을 정확하게 예측하여 기술적 숙련도를 입증해야 한다. Suntest CPS/CPS+ (Atlas) 또는 SXL-2500V2 (Seric) 인공 태양광 조사기의 경우 9개 화학물질(Nos. 1 - 9)을 시험해야 한다. 다른 인공 태양광 조사기의 경우 17개의 화학물질 (1번~17번)을 모두 시험해야 한다. 이러한 숙련도 물질은 광독성 가능성에 대한 반응 범위를 나타내도록 선택되었다. 다른 선택 기준으로는 상업적으로 이용 가능하고, 활성산소종 분석에 대한 고품질의 생체내 기준 데이터 및 고품질의 생체외 데이터가 이용 가능하며, 참여 실험실에서 시험법의 성공적인 수행을 입증하기 위한 JaCVAM-주관 검증 연구에 사용된 것이었다(20)(21).

표 A C.1. 숙련도 물질 표

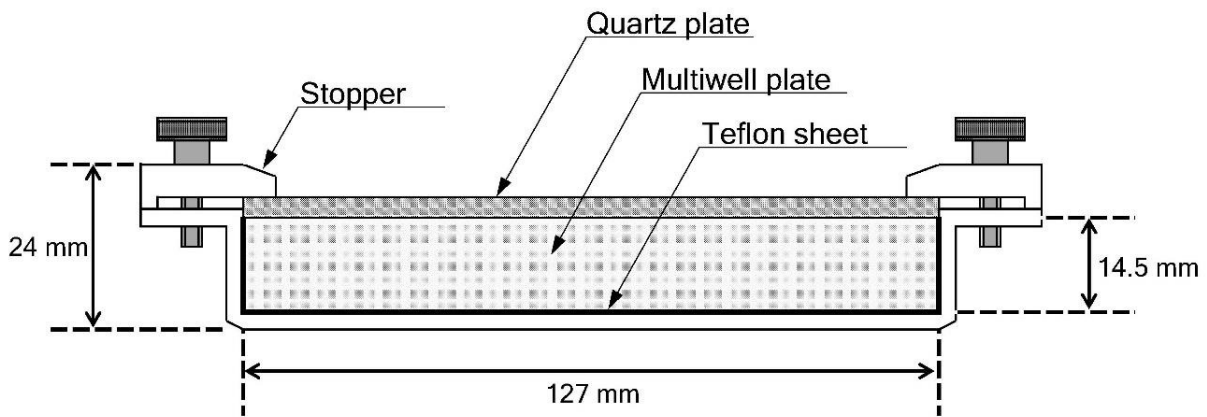
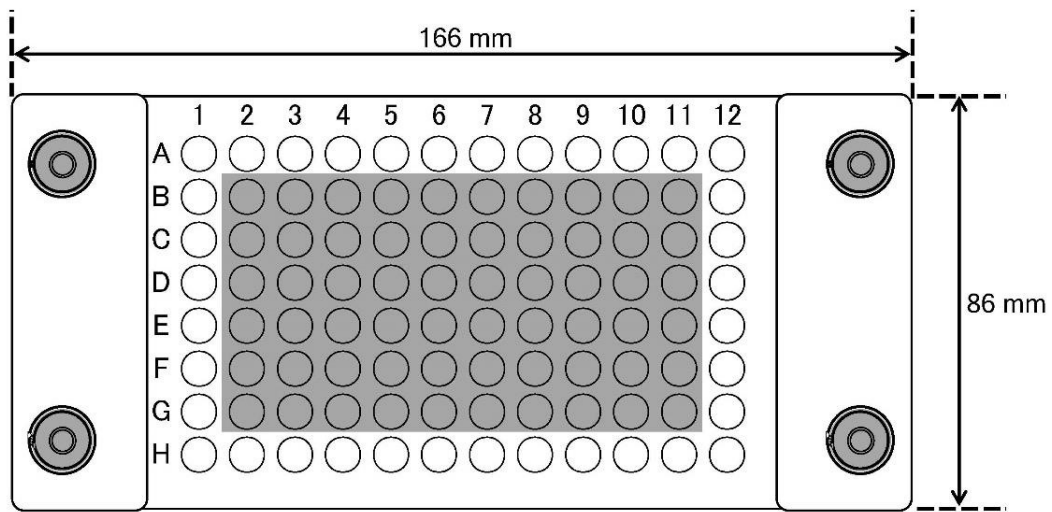
숙련도 물질에 대한 활성산소종 예상값 및 허용 범위

No.	Chemical <sup>7)</sup>	CAS No.	SO <sup>8)</sup>	SA <sup>5)</sup>	Solvent	concentration
1	p-Aminobenzoic acid	150-13-0	-8 to 12	-11 to 7	DMSO	200 µM
2	Benzocaine	94-09-7	-7 to 9	-7 to 17	DMSO	200 µM
3	Doxycycline hydrochloride	10592-13-9	115 to 429	230 to 468	DMSO	200 µM
4	Erythromycin	114-07-8	-15 to 11	-9 to 21	DMSO	200 µM
5	Fenofibrate	49562-28-9	77 to 203	-31 to 11	DMSO	20 µM
6	L-Histidine	71-00-1	-8 to 12	8 to 120	NaPB	200 µM
7	Norfloxacin	70458-96-7	131 to 271	57 to 161	DMSO	200 µM
8	8-Methoxy psoralen	298-81-7	31 to 137	0 to 126	DMSO	200 µM
9	Octyl salicylate	118-60-5	-5 to 11	-8 to 20	DMSO	20 µM
10	Acridine	260-94-6	182 to 328	121 to 243	DMSO	200 µM
11	Chlorpromazine hydrochloride	69-09-0	-56 to 70	66 to 106	DMSO	200 µM
12	Diclofenac	15307-79-6	34 to 416	47 to 437	DMSO	200 µM
13	Furosemide	54-31-9	31 to 225	-7 to 109	DMSO	200 µM
14	Ketoprofen	22071-15-4	120 to 346	77 to 151	DMSO	200 µM
15	Nalidixic acid	389-08-2	54 to 246	88 to 470	DMSO	200 µM
16	Omeprazole	73590-58-6	-221 to 103	30 to 216	DMSO	200 µM
17	Promethazine hydrochloride	58-33-3	20 to 168	-3 to 77	DMSO	200 µM

7) 모든 시험물질은 고체이다

8) 모든 값은 검증 데이터의 평균±1.96SD로 계산되었다.

부록 4. 검증 연구에서 사용한 퀴즈 반응 용기



퀴즈 플레이트의 권장 두께: ca. 3mm