

등록번호

안내서-0750-01

생체외 피부흡수시험 가이드라인

(민원인 안내서)

2009. 12.



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

독성평가연구부 특수독성과

이 안내서는 생체외 피부흡수시험 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 2009년 12월 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	B1-2009-4-001	2009.12.	생체외 피부흡수시험 가이드라인 제정
2	안내서-0750-01	-	「식약처 지침서등의 관리에 관한 규정」 개정에 따른 일괄 재분류 (규제개혁담당관실-3761호,2017.5.16)

I. 서론

1. 피부흡수시험법은 생체내(*in vivo*)시험과 생체외(*in vitro*)시험 두 가지로 구분된다. 생체내 시험방법은 전신 순환의 일반사항과 대사 정보를 얻을 수 있다는 장점이 있으나, 살아있는 동물을 사용해야 하고, 초기 흡수 상을 구분하기 어려우며, 실험에 사용하는 랫드 등 다른 종과 인체 피부의 투과도가 차이 나는 단점이 있다. 생체외 피부흡수시험방법은 시험물질이 피부를 통과하여 용액저장소로 이동한 양을 측정하는 방법으로, 인체 피부 또는 다른 종의 피부를 사용할 수 있고 시험물질에 대하여 반복 측정이 가능하며 실험동물을 사용하지 않고 노출 조건에 대한 연구가 가능하다. 또한 사용할 수 있는 시험물질의 범위가 넓고, 윤리적 이유로 생체내 시험으로는 평가할 수 없는 피부 손상과 피부 흡수에 대한 관계에 대하여 연구할 수 있는 장점이 있다.
2. 생체외 피부흡수시험은 물질의 구성에 따른 피부 흡수와 투과를 비교 할 수 있어, 인체 내 피부흡수에 의한 위험성 평가 등에 유용한 모델로 사용할 수 있을 것이다.

II. 시험개요

1. 고려사항

- 가. 본 생체외(*in vitro*) 시험은 초기 피부 흡수 평가를 위한 방법으로 사용가능하나, 피부 흡수에 대해 더 자세한 평가가 필요한 경우, 생체내(*in vivo*) 시험 결과도 함께 고려하여야 한다.
- 나. 피부투과는 일반적으로 수동확산을 통해 이루어지고, 각질층이 주요 확산 장벽으로 작용하므로, 피부 적출 후에도 피부는 고유의 투과도를 유지할 수 있다. 시험물질의 흡수만을 측정할 경우에는 대사활성이 없는 피부를 사용하고, 흡수와 함께 피부대사를 측정할 경우에는 생리활성이 있는 신선한 피부를 사용한다.

2. 시험 원리

- 가. 방사성 동위원소로 표지된 시험물질을 피부 표면에 처리한다. 시험물질을 특정 조건하에서 특정 시간동안 피부에 노출시킨 후 적절한 세척과정을 통해 세척한다. 수용 액(receptor fluid)을 정해진 시간 간격으로 채취하여 시험물질이나 대사물질을 분석한다.

나. 대사활성이 있는 피부를 사용할 때에는 시험물질의 대사산물을 적절한 방법으로 분석한다. 시험이 끝난 후 시험물질과 그 대사산물의 분포를 정량화한다.

다. 시험 완료 후, 수용액과 시험물질이 처치된 피부를 분석하여 물질의 피부 흡수도를 평가한다. 수용액의 측정수치만으로 흡수도를 산정할 수 없다면, 피부에 잔류한 시험물질을 피부에 흡수된 것으로 간주한다. 세척액 내의 시험물질이나 피부층에 남아있는 물질을 분석하여 시험물질의 분포 성향과 회수율과 같은 항목을 추가로 분석할 수 있다.

라. 시험법의 정확도와 신뢰성을 위해 카페인, 벤조산, 테스토스테론과 같은 표준물질과 함께 시험할 수 있다.

III. 시험 방법

1. 시험준비

가. 피부투과장치(Diffusion cell)

피부투과장치는 공여칸(donor chamber)과 수용칸(receptor chamber)으로 구성되어 있고 이 사이에 피부를 고정한다. 동일한 시험에 사용하는 각 셀은 0.3~5 cm² 범위 내에서 동일한 표면적을 갖는다. 준비된 피부는 각질층(stratum corneum)이 위로 위치하도록 하여 피부투과장치에 고정한다. 피부투과장치는 피부를 잘 밀착시켜야 하고, 피부 하단의 수용액을 균질하게 혼합시킬 수 있어야 하며, 수용액의 채취가 용이하고, 장치와 내용물의 온도 조절이 용이해야 한다. 피부투과장치는 시험물질과 반응을 최소화하기 위해 유리나 폴리테트라플루오로에틸렌과 같은 비활성 물질로 만들어진 장치를 이용한다. 시료의 확산 방법은 정적(static) 또는 동적(flow-through) 확산방법 모두 사용이 가능하다. 공여칸은 피부가 시험물질에 노출되는 동안 열린 상태로 두는 것이 일반적이나, 특정한 목적이 있다면 닫아 둘 수도 있다.

나. 수용액(Receptor fluid)

1) 수용액의 선택

가) 수용액은 피부조직과 친화성이 있어야 하며, 시험물질의 용해도를 고려하여 선택한다.

나) 생리활성이 없는 피부를 이용하여 수용성 물질을 평가하는 경우, 수용액은

pH 7.4의 생리 식염수를 사용한다. 소수성 시험물질을 평가하는 경우, 물·에탄올 혼합액(1:1) 또는 6% 폴리에틸렌글리콜20올레일에 텔액을 사용한다.

다) 대사적 활성이 있는 피부를 사용하는 경우, 세포배양액과 같은 생리학적 수용 액을 선택한다. 비극성 시험물질을 평가하는 경우, 시험물질이 수용 액에 용해되지 않을 수 있으므로, 6% 폴리에틸렌글리콜20올레일에 텔액이나 5% 우혈청 알부민을 생리식염수에 가하여 용해도를 높일 수 있다.

라) 방사선이 표지되지 않은 시험물질을 평가하는 경우의 수용 액은 분석 과정을 고려하여 선택한다.

2) 수용 액 교환/유속

가) 정적확산장치에서 수용 액의 양은 일반적으로 2-20 mL이며, 용액은 지속적으로 균질하게 혼합되어야 하며, 동적확산장치에서 수용칸의 수용 액 양은 일반적으로 0.1-5 mL이다.

나) 유속은 시험물질의 확산에 영향을 미쳐서는 안된다. 일반적으로 유속은 공여칸의 양이 3 mL(3회 교환/hr)일 때 9 mL/hr이거나 공여칸이 양이 150-300 μ L(5-10회 교환/hr)일 때 1.5 mL/hr이다. 더 낮은 유속(교환하지 않거나~시간당 1회 교환)은 방사선 표지되지 않은 물질을 평가하거나 수용 액내 시험물질의 양이 낮아 분석이 어려울 때 사용한다.

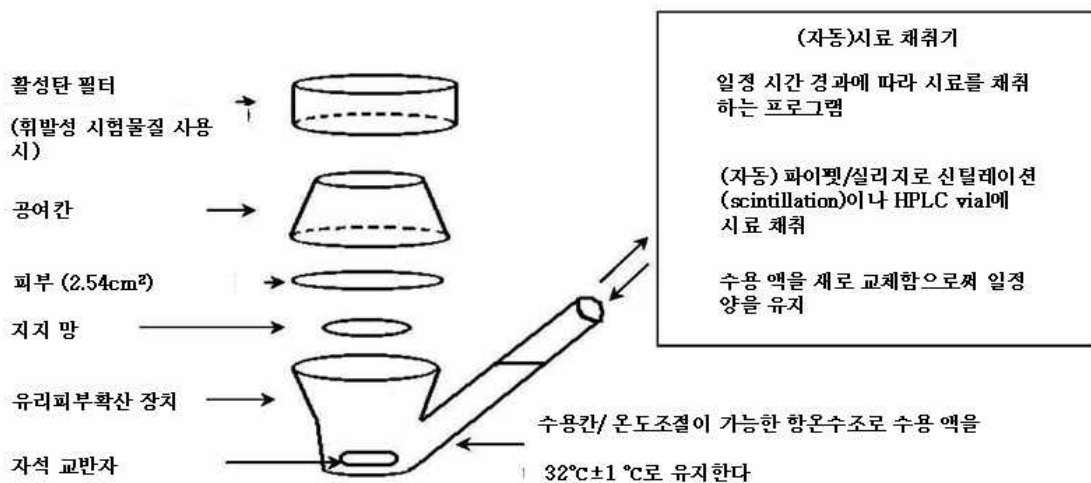


그림 1. 생체내 피부흡수시험을 위한 정적 확산장치의 예

다. 대사적 활성의 유지

- 1) 피부 대사를 검사하고자 할 때에는 신선하게 적출된 피부를 가능한 빨리 사용하여야 하고, 피부 대사 활동을 유지할 수 있는 조건하에서 시험을 진행하여야 한다.
- 2) 피부투과는 수동 확산 과정이므로, 방사선 표지 물질의 피부흡수를 평가할 때 대사활성을 고려하지 않아도 좋다. 그러나 전신 흡수 전 피부 내에서 생리적 변성이 발생하는 물질의 경우 시험 기간동안 적절한 대사활성이 유지되는지 확인해야 한다.
- 3) 동물에서 한번 적출한 피부는 대사활성의 변화가 발생할 수 있으므로, 피부의 대사 활성을 평가하기 위해 일반적으로 글루코오스를 지표로 이용한다.
- 4) 대사반응의 정도는 상피와 같이 대사적으로 활성을 가지 조직에 시험물질이 머무르는 시간과 관계가 있다. 물질이 머무르는 시간이 길면 대사될 가능성이 크다.

라. 피부 준비

- 1) 피부는 시험에 적합한 상태로 준비되어야 한다. 취급하는 과정에서 각질층의 손상이 발생할 수 있으므로, 시험 전 반드시 피부의 상태를 점검해야 한다.
- 2) 인체 피부를 이용한 피부흡수시험은 복부나 흉부 피부를 일반적으로 사용한다. 돼지 피부는 귀나 옆구리, 등이나 사지의 피부를 흔히 사용한다.
- 3) 랫드의 피부를 사용할 경우 배측 또는 복측 피부를 사용하나, 배측 피부는 생체내 피부흡수시험과 같은 목적으로 시험을 할 때 사용한다.
- 4) 상피 조직을 분리하는 방법은 피부의 모양이나 낭의 깊이 등 유전적인 특성을 고려하여 달라질 수 있다. 일반적으로 인체와 돼지 피부는 열을 이용하여 상피를 분리하는데 60℃에서 1~2분간 반응시킨 후 핀셋을 이용하여 상피를 벗겨낼 수 있다. 랫드 피부에서 상피를 분리할 때는 주로 화학물질을 이용하는데 2M sodium bromide를 사용한다. Protease 또는 bacterial collagenase 등 효소를 이용하여 분리할 수 있다.
- 5) 피부채취기를 통해 채취한 200-400 μm 두께의 피부를 일반적으로 사용한다. 피부 전층을 시험에 사용할 수도 있으나 1mm 이상의 두꺼운 피부는 시험물질이 피부 전층에 분포하는 경향을 확인하는 목적 외에는 사용하지 않는다.

다.

- 6) 사용하고자 하는 동물 중, 해부학적 부위와 피부 준비 방법은 시험 목적에 적합하여야 하며, 시험당 최소 4 회 반복시험한다.

마. 피부의 보관

- 1) 일반적으로 적출된 피부는 24시간 내에 사용되어야 하지만, 검사하고자 하는 대사효소와 저장 온도에 따라 보관 기간이 달라질 수 있다. 보관 되어진 피부를 시험에 사용할 때에는, 시험 전 반드시 구조적인 무결성이 입증되어야 한다.
- 2) 동물과 인체 피부는 영하 20℃에서 수개월 보관이 가능하다. 보관 전에 피하 조직을 제거하는 것이 후에 사용할 때 편리하다. 영하 80℃에 보관된 피부조직은 투과성이 증가하기 때문에 피부를 너무 낮은 온도에 보관하는 것은 적절하지 않다.

바. 피부 구조의 무결성

- 1) 보관된 피부를 시험에 사용할 때에는, 시험 전 반드시 구조적인 무결성이 입증되어야 한다. 적합성 평가는 짧은 시간 내에 수행되어야 하고 시험물질을 적용하기 바로 전에 수행하는 것이 바람직하다.
- 2) 피부 적합성을 평가하기 위한 다양한 방법이 있으나 시험물질의 투과를 통한 피부 구조 무결성 검사가 유용하다.
- 3) 물리적 손상을 시각적 검사를 통해 평가하여 적합하지 않은 피부를 제거하고, 다음으로 피부를 장치에 고정하여 평형을 유지시키고 수화시킨다.
- 4) 적합성을 평가하기 위해 다음과 같은 방법 중 하나를 사용한다.

① 시험 전 적합성 평가

- 교류 전기 저항이 피부의 정상 범위(2 볼트 이상)인지 확인할 것
- 각질의 경피수분손실(trans-epidermal water loss; TEWL)이 피부의 정상 범위인지 확인할 것
- 삼중수(tritiated water)와 같은 표준시험물질의 투과성이 적절한지 확인할 것. 그러나 피부에 적용시간 중 주변 온도, 수분에 의하여 물리적으로 손상된 피부는 투과력을 높인다.

② 시험 중 적합성 평가

표준물질의 양이 시료의 열역학적 분포에 영향을 주지 않을 정도로 작거나, 표준물질과 시료의 log P값의 차가 크지 않을 경우, 시험 준비 과정 중 14C로 표시한 시험물질에 활성이 높은 3H-sucrose를 첨가하여 적합성을 평가한다.

③ 시험 후 피부 적합성 평가

시험 전 적합성 평가 방법은 시험물질을 노출시키지 전에 수행되어야 하나, 세척, 수화/변질, 시험물질 조성에 의한 영향으로 각질층의 무결성이 감소할 수 있다. 그러므로 시험 후 적합성 평가는 모발 관리 제품과 같이 짧은 시간 노출되는 물질에 대하여 평가할 때 적합하며, 시험에 사용한 피부의 손상도를 파악할 때 사용된다.

사. 시험물질

- 1) 시험물질이란 피부흡수도를 검사하고자 하는 물질이다. 방사성 동위원소가 표지된 시험물질이 가장 이상적이다. 시험물질은 14C와 같이 안정하고, 98% 이상의 방사화학적 순도를 갖는 물질로 표지하여 물질의 분포와 회수율을 측정한다. 필요한 경우, 표지물질은 비표지물질로 희석할 수 있으며, 시험물질의 고유의 활성과 방사화학적 순도는 반드시 알아야 한다.
- 2) 마이크로캡슐이나 과립형 물질 또는 계면활성제, 무기 성분 등은 방사선 표지를 이용한 시료처리가 불가능하다. 이런 경우 다른 방법도 사용가능하다.

아. 시험조제물질

- 1) 시험물질은 실제 노출 경로와 유사한 방식으로 (자체 또는 희석하거나, 혹은 용매와 함께 조제) 조제한다. 필요한 경우 시험물질을 희석할 수 있으며 희석용매는 일반적으로 물로 한다.
- 2) 가루와 같은 고체 시험물질은 피부부착성을 높이기 위하여 소량의 물로 적셔서 사용한다.
- 3) 시험물질의 안정성과 균질성은 반드시 확인한다.

2. 온도 및 습도

가. 피부 온도 변화는 흡수과정에 영향을 줄 수 있으므로, 장치 중 수용 액의 온

도는 $32 \pm 1^\circ\text{C}$ 정도로 일정하게 유지한다.

나. 피부의 온도를 일정하게 유지하기 위해 항온수조나 전열기를 사용할 수 있다. 온도계를 사용하여 시험계의 피부나 수용 액이 적정온도를 유지하는지 확인한다.

다. 장치의 습도는 30-70%가 적절하다.

3. 시험방법

가. 피부적용

- 1) 일반적인 시험에서는 시험물질의 농도를 한정적으로 적용한다. 고체물질의 경우 피부 cm^2 당 1-5 mg, 액체의 경우 cm^2 당 10 μl 또는 10 mg까지 도포한다. 도포량은 시험물질의 예상되는 사용 조건이나 연구 목적, 시험물질의 물리적 성질을 고려하여 정한다. 점도가 낮은 물질의 경우 그 양을 줄일 수 있다.
- 2) 피부 내 최대흡수율을 유지하기 위해 적용하는 물질의 양을 제한하지 않을 수 있다. 적용량을 제한하지 않는 시험인 경우, (일반적으로 $100\mu\text{l}/\text{cm}^2$ 이상의 양을 적용) 일정한 유속, 흡수율, Kp 값을 통해 일정한 피부흡수상태를 유지할 수 있다.
- 3) 균일한 도포를 위해 기구를 사용할 수 있으나, 기구에 남아 있는 시험물질의 양은 시험 완료 후 결과 산출에 반영하여야 한다.
- 4) 방사선 표지 시험물질은 피부 1 cm^2 당 ^{14}C 를 37 kBp(1 μCi)로 적용하는 것이 적용 용량의 흡수율을 측정하는데 적절하다.

나. 피부투과장치의 개폐

정상적인 노출방법을 고려하여, 장치를 개방하거나 폐쇄할 수 있다. 개방형 장치는 시험물질 중 휘발성분이 증발할 수 있는 있다. 또한, 정상적인 건조과정이 있으므로, 피부의 수화에 의한 피부 구조 손상을 피할 수 있다.

다. 노출 및 시료채취 기간

피부 표면을 세척하면 물질 적용은 종료된다. 피부 노출 시간은 정상적으로 인체에 노출되는 시간과 방법을 고려하여 결정한다. 피부노출 후 수성비누와 같은 세척제로 세척하여 남아있는 여분의 시험물질을 제거하고, 세척용액은 분석을

위해 회수한다. 시험물질 제거 과정은 물질의 특성에 따라 달라질 수 있다. 피부 흡수시험에서 일반적으로 시료 추출을 24시간동안 하여 검사하고자 하는 시험물질의 피부흡수도를 파악할 수 있는데, 피부는 24시간을 경과되면서 상태가 나빠지므로 시료 추출 기간은 24시간을 넘기지 않는다. 시료의 채취는 24시간 동안 6-12회로 하나, 시험물질의 피부 흡수도 그래프를 그릴 수 있도록 시료채취 빈도를 조절할 수 있다.

라. 피부 분리

피부층을 신틸레이션액 내에서 용해하여 피부내 시험물질의 분포를 정량화하여 시험물질과 대사체를 분석한다. 피부내 시험물질의 분포를 평가하는 다른 방법을 피부를 세로로 절단하거나 방사능사진촬영(autoradiography) 또는 confocal microscopy와 같은 시각적 분석 기술을 이용할 수 있다.

마. 분석

1) 시험계의 모든 구성 요소가 분석되어야 하며, 회수율이 평가되어야 한다.(방사능표지물질의 경우 $100 \pm 10\%$ 회수를 목표로 하며, 이를 벗어났을 경우 그 이유를 보고서에 명시한다). 여기에는 시험물질 도포 기구, 공여칸, 피부 세척액, 피부, 수용 액 및 수용칸 등이 포함된다. 경우에 따라 피부를 시험물질 노출부와 비노출 테두리로 구분하기도 하며, 표피, 각질층, 진피로 구분하여 분석할 수도 있다.

바. 자료 및 보고

1) 자료

수용 액의 분석과 시험계에서 시험물질의 분포와 흡수도가 제시되어야 한다. 정해진 양의 시험물질을 노출시킨 경우 피부에서 세척된 양, 피부에 흡수된 양(가능하다면 피부 각 층에서의 잔존량) 과 수용 액에 존재하는 양(시간에 따른 비율, 절대값 혹은 노출량에 대한 백분율값)이 계산되어야 한다. 피부투과도는 때때로 수용 액 자료만을 가지고 나타내기도 한다. 그러나 시험 종료시에 시험물질이 피부에 남아 있다면 이 잔존량이 총 흡수량에 포함되어야 한다. 계산이 불가능한 지속적인 노출인 경우 투과 상수(permeability constant, K_p) 를 이용하여 흡수율을 계산한다.

2) 시험보고

시험보고서에는 시험방법의 적절성과 시험방법상에 제시되었던 평가 항목들을 모두 포함한다.

가) 시험물질 :

- 물리적 특성, 물리화학적 특성 (분자량, log P_{ow}), 순도 (방사선 지표물질의 화학적 순도)

- 표시내용 정보 (예, 제품군번호)

- 수용 액에서의 용해도

나) 시험 준비 :

- 제조법과 그 방법의 적합성

- 균질성

다) 시험 조건 :

- 피부적출 동물의 종, 피부의 부위, 피부 적출법, 피부 저장 조건, 전처리 방법 (세척, 항생제 처리 등), 피부 구조의 무결성 측정, 대사성 등

- 시험장치 디자인, 수용 액의 조성, 수용 액의 유량, 시료채취 시간과 절차

- 시험물질 적용 방법, 적용량의 정량화

- 노출 기간

- 피부 세척법

- 피부 분석법, 피부 각 층에서의 흡수도를 평가하기 위한 피부 분절법

- 피부투과장치와 시험 관련 장비의 세척 절차

- 분석 방법, 추출 기술, 분석법의 한계, 분석법의 검증

라) 결과 :

- 회수율 (적용량 = 피부 세척량 + 피부흡수량 + 수용 액으로의 투과량 + 장치 세척량)

- 각각의 장치에서의 회수율

- 흡수도

- 도표화된 흡수도 자료 (비율, 양, 백분율)

마) 결과 고찰

바) 결론

IV. 참고문헌

- (1) OECD (2004). Test Guideline 428: Skin absorption: *in vitro* Method. OECD, Paris.
- (2) OECD (2004). Test Guideline 427: Skin absorption: *in vivo* Method. OECD, Paris.
- (3) OECD (2004). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.
- (4) OECD (2000). Report of the Meeting of the OECD Extended Steering Committee for Percutaneous Absorption Testing, Annex 1 to ENV/JM/TG(2000)5. OECD, Paris.

- (5) Kemppainen BW and Reifenrath WG. (1990). Methods for skin absorption. CRC Press, Boca Raton.
- (6) Bronaugh RL and Collier, SW. (1991). Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Studies, in *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications*, RL Bronaugh and HI Maibach, Eds., CRC Press, Boca Raton, pp. 237-241.
- (7) Bronaugh RL and Maibach HI. (1991). *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications*. CRC Press, Boca Raton.
- (8) European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (1993). Monograph No. 20, Percutaneous Absorption, ECETOC, Brussels.
- (9) Diembeck W, Beck H, Benech-Kieffer F, Courtellemont P, Dupuis J, Lovell W, Paye M, Spengler J, Steiling W (1999). Test Guidelines for *In Vitro* Assessment of Dermal Absorption and Percutaneous Penetration of Cosmetic Ingredients, *Fd Chem Tox*, 37, 191-205.
- (10) Recommended Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Rate Studies (1996). US Federal Register, Vol. 61, No. 65.
- (11) Howes D, Guy R, Hadgraft J, Heyling JR *et al.* (1996). Methods for assessing percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report ATLA 24, 81 R10
- (12) Schaefer H and Redelmeier TE. (1996). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basel.
- (13) Robert MS and Walters KA. (1998). Dermal absorption and toxicity assessment. Marcel Dekker, New York.
- (14) Jewell, C., Heylings JR., Clowes, HM. And Williams, FM. (2000). Percutaneous absorption and metabolism of dinitrochlorobenzene in vitro. *Arch Toxicol* 74: 356-365.