**중국식품약품검정연구원의**

**“피부 감작성 통합 테스트 및 평가 전략 응용 기술지침”에 관한 통지**

발표일: 2024-07-08

각 관련 기관:

업계의 화장품 안전성 평가능력과 수준을 향상시키도록 인도하고, 화장품 안전성 평가업무를 규범화하며, 화장품 안전성 평가 제도의 질서 있는 시행을 추진하기 위해 “화장품감독관리조례”, “화장품 안전성 평가 기술 지침(2021년판)”과 “화장품 원료 안전 정보 관리 조치를 개선하는 유관 사항에 관한 공고” 등의 법규와 규범성 문건에 따라 중국식품약품검정연구원은 “피부 감작성 통합 테스트 및 평가 전략 응용 기술지침”(별첨 참고)을 제정하고, 공포한다.

이에 특별히 통보한다.

별첨: “피부 감작성 통합 테스트 및 평가 전략 응용 기술지침”

중국식품약품검정연구원

2024년 7월 8일

별첨4

**피부 감작성 통합 테스트 및**

**평가 전략 응용 기술지침**

——“3개 중 2개 선택 시험” 전략

중국식품약품검정연구원

목록

[1. 개요 4](#_Toc182299520)

[2. 적용 범위 4](#_Toc182299521)

[3. 기본 원칙 5](#_Toc182299522)

[4. 사용 가능한 대체방법 5](#_Toc182299523)

[5. 주의사항 6](#_Toc182299524)

[부록1 8](#_Toc182299525)

[부록2 10](#_Toc182299526)

[부록3 11](#_Toc182299527)

[부록4 12](#_Toc182299528)

**1. 개요**

피부 감작반응(알레르기 접촉 피부염, skin sensitization, allergic contact dermatitis)은 피부가 하나의 물질에 대해 발생하는 면역원성 피부 반응이다. 피부 감작반응 시험은 화장품 원료의 감작성을 평가하는 일반적인 방법이며, 동물 복지와 과학기술이 발전함에 따라, 국제적으로도 점차적으로 체외 시험, 비시험 독성 예측 방법 등의 다양한 독성학 평가도구를 조합한 피부 감작성 통합 테스트와 평가 전략을 채택하여 화장품 원료의 잠재적인 감작 위험을 평가하는데 사용하고 있다.

현재 과학적으로는 피부 감작이 단백질 공유 결합을 시작으로 세포, 조직기관 등의 일련의 생물학 응답을 거쳐 최종적으로 알레르기 접촉성 피부염이라는 유해한 결과를 초래한다는 점을 보편적으로 인정하고 있다. 피부 감작성 통합 테스트와 평가 전략은 독성발현경로(Adverse Outcome Pathway, AOP) 및 그 중에서 각 핵심 사건(Key Events, KEs)에 대해 연구개발한 일련의 대체 독성학 시험을 바탕으로 평가하려는 원료 관련 데이터를 통합하여 증거 가중치 분석을 진행하고, 화장품 원료의 잠재적인 피부 감작성 위험에 대해 평가한다.

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 화학구조와 성질 |  | 분자초기사건 |  | 세포 효과 |  | 조직기관 반응 |  | 신체반응 |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 평가대기물질 |  | KE1:  피부 단백질과 공유 결합 |  | KE2: 각질 형성 세포응답 |  | KE4:  림프T세포 활성화 |  | 활성화 후 ACD |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  | KE3: 수지상세포 응답 |  |  |  |  |

**그림1 피부 감작 AOP 표시도**

피부 감작성 AOP에서 핵심 사건 KE1은 분자 초기사건이고, 핵심 사건 KE2와 KE3은 각각 각질 형성세포 면역 응답과 수지상세포 면역 응답이며, 핵심 사건 KE4는 조직기관 반응 응답(림프T세포 증식)이다.

**2. 적용 범위**

본 응용지침은 화장품 원료 피부 감작성 평가에 적용한다. 피부 감작성 AOP 검사 핵심 사건 KE1~KE3의 독성학 시험 방법을 채택해서 “3개 중 2개 선택 시험” 전략을 구성하며, 적용범위는 선택한 모든 시험 방법 적용성의 요구사항에 부합해야 한다.

**3. 기본 원칙**

화장품 원료의 특징을 결합하고, 피부 감작 AOP의 메커니즘을 바탕으로 고정된 검사 데이터를 점진적으로 획득 및 평가, 검사하는 순서 테스트 전략을 형성하며, 획득한 검사 결과에 따라 후속 검사를 진행해야 하는지 여부를 결정하고, 화장품 원료 피부 감작성에 대해 위험 식별을 진행할 수 있다. 전략에서는 AOP 중에 어떤 핵심 사건을 포함하는지, 시험 방법의 선택 순서, 이미 불확실성을 알고 있다는 점에 대한 고려(예: 선택한 시험 방법의 국한성, 양성 결과 판정의 한계치 경계 범위 등) 내용을 설명해야 한다.

**4. 사용 가능한 대체방법**

현재 “화장품안전기술규범”에서 피부 감작성 검사에 사용하는 대체 방법은 피부 감작반응: 국부 림프절 시험(LLNA: DA와 LLNA: BrdU-ELISA), 체외 피부 감작반응 시험: 직접 펩타이드 반응시험(DPRA), 아미노산 유도체화 반응시험 방법(ADRA), 인간 세포주 활성화 시험(h-CLAT), U937 세포 활성화 시험 방법(U-SENS)과 각질 세포 루시페린 보고 유전자 테스트 LuSens 방법(LuSens)을 포함한다.

표1 피부 감작성 대체 시험 결과 판정 요구사항

| **핵심 사건** | **방법 명칭** | **결과 판정 요구사항** |
| --- | --- | --- |
| KE1 | 화장품용 화학 원료 체외 피부 감작반응:  직접 펩타이드 반응시험(DPRA) | 상세 내용 부록1 참고 |
| 체외 피부 감작반응 아미노산 유도체화 반응 시험 방법(ADRA) | 결과 판정 및 불확정 분석 설명 필요 |
| KE2 | 체외 피부 감작반응 각질 세포 루시페린 보고 유전자 테스트 LuSens 방법(LuSens) | 상세 내용 부록2 참고 |
| KE3 | 체외 피부 감작반응 인간세포주 활성화 시험  (h-CLAT) | 상세 내용 부록3 참고 |
| 체외 피부 감작반응 U937세포 활성화 시험  (U-SENS) | 결과 판정 및 불확정 분석 설명 필요 |
| KE4 | 피부 감작반응: 국부 림프절 시험: DA(LLNA: DA) | 피험물 감작능력과 강도를 얻을 수 있음 |
| 피부 감작반응: 국부 림프절 시험:  BrdU-ELISA(LLNA: BrdU-ELISA) |

그 중에서 국부 림프절 시험(LLNA: DA와 LLNA: BrdU-ELISA)를 KE4 검사에 사용하고, 시험 결과는 피험물의 감작 능력과 강도를 얻을 수 있으며, 이러한 결과는 제한적인 범위 내에서 인간에게 추론할 수 있다.

DPRA와 ADRA 시험은 KE1 검사에 사용한다. LuSens 시험은 KE2 검사에 사용한다. h-CLAT와 U-SENS 시험은 KE3 검사에 사용한다. “3개 중 2개 선택 시험” 전략은 KE1~KE3 중에서 임의로 2개의 핵심 사건을 선택해야 하며, 해당되는 1개 시험 방법을 각각 선택해서 검사를 진행한다. 만일 2개의 핵심 사건 검사 결론이 일치하고, 시험 결과가 모두 한계치 경계 범위 이내에 있을 경우, 일치된 결론에 따라 화장품 원료가 피부 감작성이 있는지 여부를 판정한다. 그렇지 않을 경우 3번째 핵심 사건 검사를 진행하고, 3개의 핵심 사건 검사 결론 중에 일치된 2개 결론에 따라 화장품 원료에 피부 감작성이 있는지 여부를 판정한다. 만일 3개의 핵심 사건 검사 결론에 모순이 존재하거나(1개는 양성 결과, 1개는 음성 결과, 1개 결과는 한계치 경계 범위 이내) 그 중에서 2개 이상의 검사 결과가 모두 한계치 경계 범위 이내일 경우 피부 감작성 위험 확정 불가로 판정한다.

**5. 주의사항**

“3개 중 2개 선택 시험” 전략의 신뢰성은 구성 전략의 시험 방법 적용성과 국한성, 원료 물리화학성질 등의 다양한 요인의 종합적인 영향을 받으며, 예측 결과에는 일정한 불확실성이 존재하며, 평가과정에서 이를 설명해야 한다. 예를 들어 h-CLAT 방법을 채택 시 피험물에 가용성이 있도록 요구하고, 옥탄올-물 분배 계수(LogKow)>3.5의 원료에 대해 위음성이 나타나기 쉬운 결과는 해당 핵심 사건을 검사하는 기타 구성 전략을 채택하거나 기타 피부 감작성 평가 방법을 선택할 수 있다. (예: 피부 감작반응 시험 또는 국부 림프절 시험 등)

각 시험 방법마다 명확한 양성 결과 판정 한계치가 있지만, 한계치에 가까운 시험 결과로 전략을 구성한 경우, 결론의 신뢰도가 떨어지며, 통계 시험 방법 검증 데이터를 통해 양성 판정의 한계치 경계 범위(borderline range)를 얻을 수 있고, 검사 결과는 한계치 경계 범위 내에서 해당 핵심 사건을 검사하는 기타 시험 방법 구성 전략을 채택하거나 기타 피부 감작성 평가방법을 선택할 수 있다.

본 지침 및 부록은 DPRA, LuSens와 h-CLAT 시험으로 “3개 중 2개 선택 시험” 전략 예시를 보여주는 것일 뿐이며, 중국 “화장품안전기술규범”에 수록되지 않은 기타 해외 권위적인 대체방법 검증기관이 공포한 방법을 선택할 경우, 방법의 적용성, 핵심 사건 검사, 결과 판정 및 불확실성 분석(예: 한계치 경계 범위 등)을 설명해야 한다.

부록1

직접 펩타이드 반응시험(DPRA)

DPRA의 요구사항에 따라 검사를 진행한다. 시험 결과 판정기준에 따라 1:10 시스테인 폴리펩타이드와 1:50 라이신 폴리펩타이드 모델로 판정 시, 양성 결과 판정값은 6.38%이고, 한계치 경계 범위는 4.95%~8.32%이다. 1:10 시스테인 폴리펩타이드 모델로 판정 시 양성 결과 판정값은 13.89%이고, 한계치 경계 범위는 10.56%~18.47%이다. 결과 판정 전략은 그림2와 같다.

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | | |  |  |  |  | 재시험 |  |  | |  |
| **시험별 검사 요구** | | |  |  |  | 아니오 | | |  | |  |
|  | | |  |  |  |
| 폴리펩타이드 소모 비율 0~4.95%? | | | 네 | 음성 |  | 폴리펩타이드 소모 비율 0~3%? | | | | 네 | 음성 |
| 아니오 | | |  |  |  |  | | |  |  |  |
| 폴리펩타이드 소모 비율>8.32%? | | | 네 | 양성 |  | 폴리펩타이드 소모 비율>10%? | | | | 네 | 양성 |
| 아니오 | | |  |  |  | 아니오 | | |  | |  |
| 폴리펩타이드 비율 4.95%~8.32%  결과가 한계치 경계 범위 이내 | | |  |  |  | 재시험 | | |  | |  |
|  | | |  |  |  |  | | |  | |  |
|  | 재시험 |  | 재시험 진행 시 2회 검사 결론에 따라 판정한다.  - 2회 결과가 양성일 경우 양성으로 판정한다.  - 2회 결과가 음성일 경우 음성으로 판정한다.  - 2회 결과가 모두 4.95%~8.32% 사이일 경우 한계치 경계 범위 이내로 판정한다.  2회 시험결과가 불일치할 경우, 3차 시험을 진행할 수 있고, 2회 일치된 결과에 따라 판정한다.  2회 결과가 모두 한계치 경계 범위 이내이거나 1회 결과가 한계치 경계 범위 이내이며, 1회 양성 결과, 1회 음성 결과일 경우 최종 판정은 한계치 경계 범위 이내이다. | | | | | | | | |
|  | | |

1:10 시스테인 폴리펩타이드와 1:50 라이신 폴리펩타이드 모델

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | | |  |  |  |  | 재시험 |  |  | |  |
| **시험별 검사 요구** | | |  |  |  | 아니오 | | |  | |  |
|  | | |  |  |  |
| 폴리펩타이드 소모 비율 0~10.56%? | | | 네 | 음성 |  | 폴리펩타이드 소모 비율 0~9%? | | | | 네 | 음성 |
| 아니오 | | |  |  |  |  | | |  |  |  |
| 폴리펩타이드 소모 비율>18.47%? | | | 네 | 양성 |  | 폴리펩타이드 소모 비율>17%? | | | | 네 | 양성 |
| 아니오 | | |  |  |  | 아니오 | | |  | |  |
| 폴리펩타이드 비율 10.56%~18.47%  결과가 한계치 경계 범위 이내 | | |  |  |  | 재시험 | | |  | |  |
|  | | |  |  |  |  | | |  | |  |
|  | 재시험 |  | 재시험 진행 시 2회 검사 결론에 따라 판정한다.  - 2회 결과가 양성일 경우 양성으로 판정한다.  - 2회 결과가 음성일 경우 음성으로 판정한다.  - 2회 결과가 모두 10.56%~18.47% 사이일 경우 한계치 경계 범위 이내로 판정한다.  2회 시험결과가 불일치할 경우, 3차 시험을 진행할 수 있고, 2회 일치된 결과에 따라 판정한다.  2회 결과가 모두 한계치 경계 범위 이내이거나 1회 결과가 한계치 경계 범위 이내이며, 1회 양성 결과, 1회 음성 결과일 경우 최종 판정은 한계치 경계 범위 이내이다. | | | | | | | | |
|  | | |

1:10 시스테인 폴리펩타이드 모델

그림2 DPRA전략 절차 표시도

부록2

각질 세포 루시페린 보고 유전자 테스트 LuSens 방법

LuSens의 요구사항에 따라 검사를 진행한다. 시험 결과 판정기준에 따라 양성 결과 판정치는 1.5배이고, 한계치 경계 범위는 1.28~1.76배이다. 결과 판정 전략은 그림3을 참고한다.

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 유도배수≥1.76%?  최소 2개 연속 테스트 농도와 용제 대조군 비교에서 통계학적 차이가 존재하며, 세포 생존률≥70%? | | | | | 아니오 | 유도배수<1.28이며, 최소 1개 농도 세포 생존률<70% 또는 최대 무세포 독성 테스트 농도가 2000µM에 도달(또는 2000µg/mL 분자량 미지의 물질)? | | 네 |  |
| 음성 |
|  |
|  | 네 | | | | |  |  |  |
|  |  | | | | |  | 아니오 | |  |  |
| 테스트 농도  조정 재시험 | | 아니오 | 최소 3개의 테스트 농도에 세포 독성 없음? | | |  |  |  |
| 1.28≤유도배수<1.76이며, 최소 2개 연속  테스트 농도와 용제 대조군 비교에서 통계학적 차이가 존재하고, 세포 생존률≥70%? | |
|  |  | | 네 | | |  | 네 | |  |  |
|  |  | |  | 양성 |  |  | 최소 3개 테스트 농도에 세포 독성 없음? | | 아니오 | 테스트 농도 조정 재시험 |
| 최소 2회 평행 시험을 진행하고, 2회 검사 결론에 따라 판정한다.  - 2회 결과가 양성일 경우 양성으로 판정한다.  - 2회 결과가 음성일 경우 음성으로 판정한다.  - 2회 결과가 모두 한계치 경계 범위 이내일 경우 한계치 경계 범위 이내로 판정한다.  2회 시험결과가 불일치할 경우, 3차 시험을 진행할 수 있고, 2회 일치된 결과에 따라 판정한다.  2회 결과가 모두 한계치 경계 범위 이내이거나 1회 결과가 한계치 경계 범위 이내이며, 1회 양성 결과, 1회 음성 결과일 경우 최종 판정은 한계치 경계 범위 이내이다. | | | | | | | | 네 |  | |
| 한계치 경계 범위 이내 |
|  |

그림3 LuSens전략 절차 표시도

부록3

인간 세포주 활성화 시험(h-CLAT)

h-CLAT의 요구사항에 따라 검사를 진행한다. 시험 결과 판정기준에 따라 양성 결과 판정치 CD86 유도값은 150%일 경우, 한계치 경계 범위는 122%~184%이며, CD54 유도값이 200%일 경우 한계치 경계 범위는 157%~255%이다. 결과 판정 전략은 그림4를 참고한다.

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| CD54 유도값≤157%와  CD86 유도값≤122%? | 네 |  | |  | | | | | | |
| 음성 | |
|  | |
| 아니오 |  | 아니오 | | | |  |  | | |  |
| CD54 유도값≤255%와  CD86 유도값≤184%? | 네 | 세포 활성≥50%? | | | | 네 | 한계치 경계 범위 이내 | |  | |
| 아니오 |  |  | | | |  |  | |  | |
|  | 음성 | |  |
| CD54 유도값≥255%  및/또는  CD86 유도값>184%? | 네 | 아니오 | | | | 네 |  |  | | |
| 양성 |
| 세포 활성≥50%? | | | |
|  |
|  | | | | | | | | | | |
| 최소 2회 평행 시험을 진행하고, 2회 검사 결론에 따라 판정한다.  - 2회 결과가 양성일 경우 양성으로 판정한다.  - 2회 결과가 음성일 경우 음성으로 판정한다.  - 2회 결과가 모두 한계치 경계 범위 이내일 경우 한계치 경계 범위 이내로 판정한다.  2회 시험결과가 불일치할 경우, 3차 시험을 진행할 수 있고, 2회 일치된 결과에 따라 판정한다.  2회 결과가 모두 한계치 경계 범위 이내이거나 1회 결과가 한계치 경계 범위 이내이며, 1회 양성 결과, 1회 음성 결과일 경우 최종 판정은 한계치 경계 범위 이내이다. | | | | | | | | | | |

그림4 h-CLAT전략 절차 표시도

부록4

화장품 원료 “3개 중 2개 선택 시험” 전략 응용 예시

주: 예시에 사용한 데이터는 실제 데이터가 아니며, 전략 절차만을 보여준다.

1. 평가하려는 물질 정보

무색, 투명 액체, LogKow＜3.5, 기타 정보 생략

2. “3개 중 2개 선택” 시험 전략 예시

단계1: DPRA 시험을 진행하고, 1:10 시스테인 폴리펩타이드와 1:50 라이신 폴리펩타이드 모델을 채택해서 결과를 판정하고, 시스테인과 라이신 소모비율 검사의 균일값은 30%이며, 결과 판정은 양성이고(소모 비율의 균일값>8.32%이며 >10%), 중간 반응이다.

단계2: LuSens 시험을 진행하고, 검사 결과와 용제 대조군을 비교하며, 유도 배수는 1미만이고, 최대 테스트 농도 세포 활성화 생존률은 65%이며, 나머지 테스트 농도 세포 생존률은 70% 이상이고, 결과 판정은 음성이다. (용제 대조군과 비교하고, 유도 배수는 <1.28이며, 최소 1개 테스트 농도 세포 생존률이 <70%)

단계3: 상기 2개 시험 결론이 일치하지 않아서 h-CLAT 시험으로 확증을 진행하며, 검사 결과 CD86 유도값이 200%, CD54 유도값이 300%, 모든 테스트 농도 세포 생존률이 모두 80% 이상이여, 결과 판정은 양성이다. (CD54 유도값>255% 및 CD86 유도값>184%, 세포 활성≥50%)

단계4: 3개 중 2개 선택 시험 결과를 종합했을 때 DPRA와 h-CLAT 결론이 일치했으며, **해당 원료에 피부 감작 위험이 있다고 판정한다.**