

인체피부모델을 이용한 피부자극시험법의 비임상시험관리기준 적용

이원희, 김남수, 김보라*

(주)엘리드

The Application of Good Laboratory Practice (GLP) on *in Vitro* Skin Irritation Test

Won Hee Lee, Nam Soo Kim, Bora Kim*

Ellead Co., Ltd.

ABSTRACT. Various guidelines of alternative test have been published following increased interest in alternative test. Among these guidelines, *in vitro* skin irritation test is composed of applying a test substance on an artificial human skin model and determining skin irritation measured by cell viability assay using MTT test method. To perform this test to become objectively and reliably, we built all the test procedures following Good Laboratory Practice (GLP). This paper introduces the *in vitro* skin irritation test method using a human skin model and describes the process how researcher have been through to comply with GLP.

KEY WORDS: Skin irritation, Reconstructed human epidermis, GLP

서 론

최근 화장품 동물실험 금지에 관한 국내 화장품법 개정과 유럽연합 및 중국 등 대외적 환경변화로 기능성화장품 개발 및 글로벌 시장 활성화를 위한 동물대체시험법 개발 및 보급이 활발하게 이루어지고 있다. 이에 따라 식품의약품안전평가원에서는 국제적 추세에 맞는 과학적이고 객관적인 동물대체시험법을 제시하여 화장품 안전성 평가에 기여하고 화장품업계 및 독성시험 연구기관의 국제 경쟁력을 향상시키고자 기존의 화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인 7개 항목에 더하여 현재까지 *In chemico* 펩타이드 반응을 이용한 피부감작성 시험법 (Direct peptide reactivity assay, DPRA)과 인체각막유사 상피모델을 이용한 안자극시

험법이 추가 제정되었다. 이러한 동물대체시험법들은 인체와 유사한 피부나 점막 등 첨단 바이오 세포배양 기술을 응용함으로써 수많은 실험동물의 희생을 최소화한 좋은 사례들이다.

기능성화장품 심사에 관한 규정에 따르면 안전성에 관한 자료는 비임상시험관리기준 (Good Laboratory Practice, GLP)에 따라 시험한 자료라고 규정되어 있다. 또한 시험방법으로 별표1의 독성시험방법과 OECD 또는 식약처가 인정하는 동물대체시험법에 따라 수행되어야만 한다 (식품의약품안전처 고시 제 2015-14호). 이와 같이 안전성에 관한 자료는 GLP 인증 비임상시험실시기관에서 실시된 시험자료만 인정 받을 수 있기 때문에 이 기준에 부합하는 GLP 시스템을 적용하는 사례에 대하여 소개하고자 한다.

Received: 7 October 2016
Revised: 3 November 2016
Accepted: 4 November 2016

* Corresponding author: Bora Kim
325, Hwangsaeul-ro, Bundang-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do 13590, Korea
Tel: +82-31-709-9070
E-mail: bora0507@naver.com

비임상시험관리기준 (GLP)의 이해

비임상시험관리기준(GLP)는 비임상시험실시기관에서 수행하는 시험의 계획·실행·점검·기록·보고되는 체계적인 과정 및 이와 관련된 전반적 사항을 규정하는 것을 말한다. GLP는 약사법, 화장품법, 의약외

품 심사에 관한 규정에 의거하여 의약품, 의약외품, 화장품 등의 제조(수입)허가 또는 심사신청 등을 위한 목적으로 실시되는 비임상시험의 시험과정 및 결과에 대한 신뢰성을 확보하기 위하여 비임상시험실시기관의 지정·운영 관리기준 및 사후 관리 등에 대하여 규정함을 목적으로 한다 (식품의약품안전처 고시 제 2014-67 호). 비임상시험기관은 자격과 경력을 갖춘 인력, 해당 비임상시험을 실시하는데 적합한 장비, 기구 및 시설, GLP에 적합하게 비임상시험을 수행하였음을 증명하는 문서를 필수적으로 구비하여야 한다. 보다 구체적으로는 시험의 관리자로서 해당 시험의 전반적인 실시와 최종보고서에 대한 책임을 갖는 시험책임자, GLP 원칙에 따라 시험을 실시했다는 것을 증명하기 위해 문서화된 신뢰성보증업무를 수행하는 신뢰성보증부서, 시험기관 내에서 GLP 원칙이 적용되고 있음을 확인하는 운영책임자 등으로 구성된 자격과 경력을 갖춘 인력의 구성이 필수적이다. 또한 시험계의 배양 및 유지시설, 시험물질 및 대조물질의 취급시설, 시험구역, 자료보관시설, 환경 조건에 대한 관리시설, 폐기물취급시설 등의 시설과 시험수행에 적합한 장비, 기구 등을 구비하여야 한다. 뿐만 아니라 이 모든 사항들이 빠짐없이 관리되고 기록될 수 있도록 시험수행 및 신뢰성보증의 모든 절차에 대해 규정한 표준작업지침서를 보유하여야 한다. 우리나라에서는 이러한 필수요소들에 대한 식약처 등 정부기관 사찰을 통해 시험수행자격을 부여하는 형태로 운영하고 있다 (비임상시험관리기준해설서, 2014).

인체피부모델을 이용한 피부자극시험의 GLP 구축 사례

피부자극이란 시험물질을 최대 4시간 동안 적용한 후 피부에 일어나는 가역적인 손상을 지칭하는 것으로 UN

GHS(Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals)와 EU CLP(European Commission Regulation on the Classification, Labelling and Packaging of Substances and Mixtures)에서는 범주 2(Category 2)에 해당하는 물질을 자극물질로 분류하고 있다 (Table 1).

기존의 화장품 피부자극시험은 1981년 제정된 OECD Test guideline 404; Acute Dermal Irritation / Corrosion에 따라 토끼의 피부에 시험제품을 적용하여 피부부식성과 피부자극성을 평가하였다. 하지만 실험동물에게 심한 통증을 유발하고 토끼의 피부와 인체 피부의 시험결과가 일치하지 않는 등의 문제가 발생함에 따라 동물대체시험법이 개발되었고 이에 따라 피부부식성 부분은 Test guideline 430; *In Vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER), Test guideline 431; *In vitro* skin corrosion: reconstructed human *epidermis* (RHE) test method, Test guideline 435; *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion 등이 제정되면서 대체되고 있으며, 피부자극성 부분은 Test guideline 439; *in vitro* skin irritation: Reconstructed Human *Epidermis* Test Method로 대체되고 있다. 이 중 최근 본 기관에서 식품의약품안전처로부터 GLP로 인증받은 동물대체시험은 인체피부모델을 이용한 피부자극시험법으로, OECD test guideline 439, *in vitro* skin irritation: Reconstructed Human *Epidermis* Test Method라는 제목으로 2013년 7월 26일에 제정된 후 2015년 7월 28일에 한차례 개정된 바 있다. 이를 바탕으로 식품의약품안전평가원에서 2014년 4월에 “화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인 (V), 인체피부모델을 이용한 피부자극시험법”을 발표한 바 있다. 이 시험법은 인체의 피부 세포인 각질형성 세포(keratinocytes)를 공기와 액체의 계면에 노출시킨

Table 1. Skin irritation categories in UN GHS

Categories	Criteria
Irritation (Category 2) (applies to all authorities)	(1) Mean score of ≥ 2.3 and ≤ 4.0 for erythema/eschar or for oedema in at least 2 of 3 tested animals from gradings at 24, 48 and 72 hours after patch removal or, if reactions are delayed, from grades on 3 consecutive days after the onset of skin reactions; or (2) Inflammation that persists to the end of the observation period normally 14 days in at least 2 animals, particularly taking into account alopecia (limited area), hyperkeratosis, hyperplasia, and scaling; or (3) In some cases where there is pronounced variability of response among animals, with very definite positive effects related to chemical exposure in a single animal but less than the criteria above.
Mild Irritation (Category 3) (applies to only some authorities)	Mean score of ≥ 1.5 and ≤ 2.3 for erythema/eschar or for oedema from gradings in at least 2 of 3 tested animals from grades at 24, 48 and 72 hours or, if reactions are delayed, from grades on 3 consecutive days after the onset of skin reactions (when not included in the irritant category above).

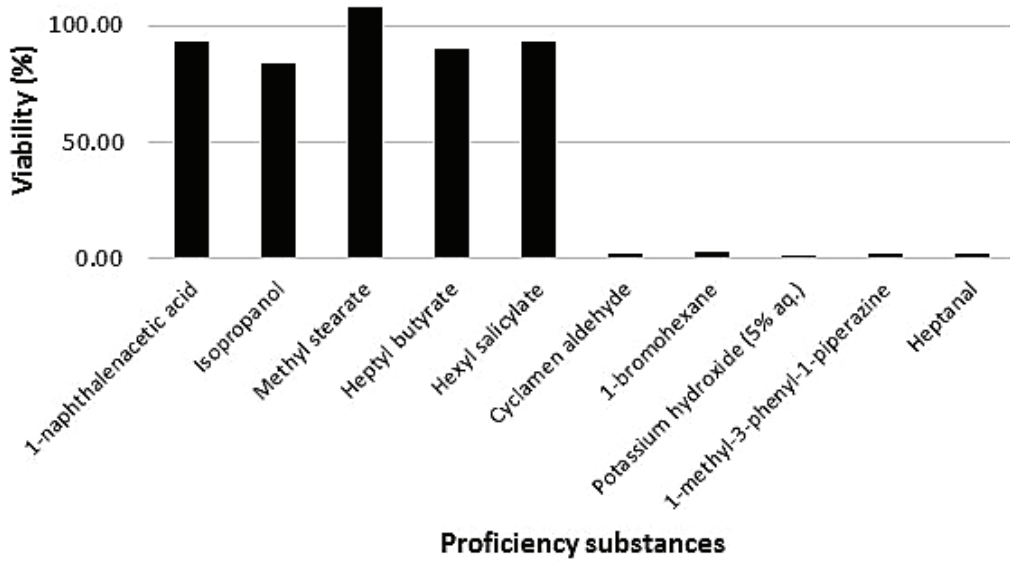


Figure 1. Test result of validation study using proficiency substances

(air-liquid) 상태에서 유도분화 과정을 통해 3차원적으로 재구성한 인체의 표피 피부모델(Reconstituted human skin equivalent model)을 사용한다 (김민지, 김배환, 2013). 이 인체피부모델에 시험물질을 적용한 후 생체 염료인 MTT(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)를 처리하여 생성되는 포르마잔염(formazan salt)을 정량함으로써 자극성 물질 여부를 파악하는 것이다. 본 시험법을 이용한다면 동물을 사용하지 않고도 GHS 범주 2에 해당하는 자극물질을 분류할 수 있어 향후 동물실험을 대체할 수 있는 유용한 시험법으로 각광받게 될 것으로 보인다.

인체피부모델은 시험에 사용하기에 앞서 일반적인 조건과 기능적인 조건을 모두 만족하여야 한다. 일반적인 조건으로는 인체의 상피조직을 재구성하기 위해

비형질전환 인체 각질세포를 이용하여 기저층(Stratum basale), 유극층(Stratum spinosum), 과립층(Stratum granulosum), 각질층(Stratum corneum)을 포함하는 다층 구조를 나타내야 하며, 세포독성 기준물질의 빠른 투과를 저해할 수 있는 피부장벽 역할을 할 수 있어야 하고, 세균, 바이러스, 미코플라스마, 진균 등으로부터 오염이 되지 않은 상태이어야 한다. 기능적인 조건은 음성대조군이 처리된 조직의 흡광도 값이 허용 범위를 만족하여야 하고, 세포독성 기준물질의 투과를 저해할 수 있는 장벽 기능을 갖추고 있어야 하며, 인체 표피와 유사한 형태학적 구조를 띠고 있어야 한다. 또한 양성대조군이 처리된 조직과 음성대조군이 처리된 조직의 흡광도 값은 반복적인 실험에서 재현성을 나타내야 하며, 인체피부모델의 공급자가 각 배치

Table 2. The proficiency substances (OECD TG439, 2004)

시험물질	CAS 번호	OECD TG 404에 따른 in vivo 점수	물리적 성상	UN GHS 범주
범주 외 화학물질 (Non-classified Chemicals)				
Naphthalene acetic acid	86-87-3	0	고체	범주 외 (비자극)
Isopropanol	67-63-0	0.3	액체	범주 외 (비자극)
Methyl stearate	112-61-8	1	고체	범주 외 (비자극)
Heptyl butyrate	5870-93-9	1.7	액체	범주 외 (GHS 범주 3)
Hexyl salicylate	6259-76-3	2	액체	범주 외 (GHS 범주 3)
범주 2로 분류된 화학물질 (Classified Chemicals)				
Cyclamen aldehyde	103-95-7	2.3	액체	범주 2
1-bromohexane	111-25-1	2.7	액체	범주 2
Potassium hydroxide (5% aq.)	1310-58-3	3	액체	범주 2
1-methyl-3-phenyl-1-piperazine	5271-27-2	3.3	고체	범주 2
Heptanal	111-71-7	3.4	액체	범주 2

정해진 생산 출하 기준에 적합함을 증명했을 때 적합한 인체피부모델로 사용될 수 있다.

현재 OECD에서 검증연구를 마친 인체피부모델 시험법은 EpiSkin™, EpiDerm™ SIT (EPI-200), SkinEthic™ RHE, LabCyte EPI-MODEL24 SIT의 총 4가지이다. 시험기관에서는 4가지의 인체피부모델 중 어느 하나를 사용하기에 앞서 이미 피부자극의 정도가 알려져 있는 표 1의 숙련도 확인용 시험물질을 이용하여 숙련도를 증명해야 한다.

본 기관에서도 숙련도 확인용 시험물질을 인체피부모델에 처리하고 생존율을 측정하여 연구자의 기술적 숙련도를 확인한 바 있으며 수차례의 반복시험에서 일정한 평가결과를 획득하였다.(Fig. 1)

일반적으로 인체피부모델은 장거리의 운송을 거쳐 수령하게 되므로 숙련도 시험의 일부로서 장벽 특성(barrier properties)을 확인하는 것도 중요하다. 장벽 특성은 세포독성 기준물질의 투과도(IC₅₀ 또는 ET₅₀)를 측정하여 평가하는데, 측정된 투과도 값과 각 인체피부모델 제조사에서 제공하는 인체피부모델의 성적서(Certificate of analysis) 상의 투과도 값을 비교함으로써 장거리의 운송이 인체피부모델의 품질에 미친 영향을 평가해야 한다.

이상의 절차를 통해 시험에 적합한 인체피부모델의 선정과 기술적 숙련도의 증명을 마치게 되면 시험물질에 대한 자극 여부를 평가하게 된다. 시험의 절차는 크게 인체피부모델 수령, 사전배양, 시험물질 처리, 시험물질 세척, 후배양, MTT처리 후 배양, 포르마잔 추출, 흡광도 측정의 순서로 진행된다. 이 때 시험물질의 처리와 더불어 매 시험마다 음성대조군과 양성대조군을 병행 처리하는 것이 필수적이며 음성대조군은 물 또는 인산염완충액, 양성대조군은 5% SDS(Sodium dodecyl sulfate) 수용액이 추천된다. 매 시험물질마다 3회 반복측정(triplication)이 필요하며, 고체 시험물질의 경우 고운 분말형태로 적용하여야 하고, 인체피부모델의 표면에 고르게 적용될 수 있도록 표면에 적절한 양의 증류수를 먼저 처리한 후 나일론메시(nylon mesh) 등을 이용하여야 한다. 사전배양, 후배양, 시험물질 처리 시간, 시험물질 세척방법 등은 각 인체피부모델 제조사의 표준작업지침서를 참고하여 정하도록 한다.

시험물질을 세척 한 후에도 인체피부모델에 시험물질이 잔존 할 수 있는데 만약 시험물질이 MTT 시약과 직접 화학반응을 일으켜 발색과정을 간섭하거나(MTT환원제), 시험물질 자체가 색을 띠고 있다면(착색제) 추가적인 대조군을 이용하여 이를 보정해야 한

다. 시험물질이 MTT를 환원하는 가에 대한 판단은 MTT용액과 증류수를 반응시켜 이를 대조군으로 하고 시험물질과 MTT 용액을 직접 반응시켰을 때 대조군과 비교하여 색깔에 변화가 있다면 해당 시험물질은 MTT 환원제로 간주한다. MTT 환원제의 경우 냉동을 통해 피사시킨 인체피부모델에 시험물질을 처리하는 추가과정을 수행 후 이 값을 통해 시험물질의 MTT 환원효과로 인한 간섭을 배제해야 한다. 착색제의 경우 인체피부모델을 추가로 준비한 후 여기에 시험물질 처리, 세척, 후배양까지 동일하게 진행한 뒤 MTT 배양과정을 생략한 채로 흡광도를 측정하여 이 값을 통해 시험물질의 착색으로 인한 간섭을 배제해야 한다(SkinEthic™ RHE SOP, 2009).

상기의 과정을 통해 얻은 양성대조군, 음성대조군 및 시험물질 처리군의 MTT 처리 후 측정된 흡광도 값을 이용해 시험물질의 자극여부를 판단한다. 음성대조군의 세포생존율을 100으로 간주하였을 때 시험물질 처리군의 세포생존율 측정값이 정해진 역치 수준인 50% 이하이면 GHS 범주 2에 해당하는 피부 자극성 물질로 판정하고, 50%를 초과하면 GHS 범주 외에 해당하는 비자극성 물질로 판정하게 된다. 이 때 양성대조군, 음성대조군 및 시험물질 처리군의 3회 반복 시험의 흡광도 표준편차가 18%를 초과하여서는 안되고(ECVAM SIVS, 2007), 음성대조군의 흡광도 값은 0.8에서 3.0 범위(OECD TG439)이어야 하며, 양성대조군의 세포생존율 측정값은 음성대조군 대비 40% 미만이어야 한다(ECVAM SIVS, 2007). 이러한 과정을 거쳐 측정된 음성대조군과 양성대조군 흡광도 측정값은 향 후 실험실 내 데이터 품질관리를 위해 기록을 유지 및 보관하여야 한다.

인체피부모델을 이용한 피부자극시험의 여러 이점에도 불구하고 시험물질에 대한 객관적이고 신뢰성있는 피부자극 여부 예측을 위해서는 모든 시험절차를 비임상시험관리기준과 같은 체계적인 기준에 맞춰 진행하여야 한다. 이를 위해 본 기관에서는 우선 운영책임자, 신뢰성보증책임자, 시험책임자, 시험물질관리책임자 등으로 구성된 경험과 전문성을 갖춘 인력을 확보하였으며 GLP 담당자로서 해당 분야에 대한 많은 교육과 훈련을 수행하였다. 또한 시험구역 설계 시 인체피부모델, 시험물질, 시험자료, 폐기물, 인력 등의 동선을 고려하여 교차오염을 미연에 방지하였고, 정전 또는 이상사태 발생 시 대책과 같은 만일의 상황에 대한 대비도 마련하였으며, 실험에 필요한 모든 장비들에 대한 validation, 사용이력관리, 정기적 점검정 등을 통해 적합한 실험 장비들을 구비 및 관리하였다.

그리고 실험에 대한 절차, 인력 및 시설에 관한 관리 절차, 시험물질 관리 절차, 신뢰성보증절차 등 모든 시험 과정에 대해 명확히 규명하고 있는 표준작업지침서를 제작하고 관리하여 신뢰성 있는 프로세스가 되도록 하였다 (Fig. 2).

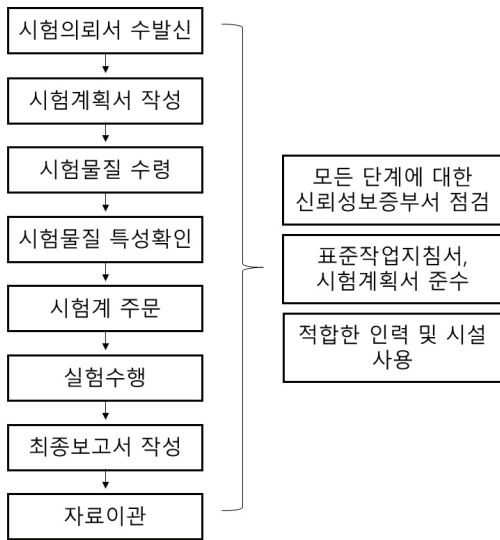


Figure 2. Flow chart of test procedure

국내 GLP 지정 현황

본 기관은 지난 2016년 4월에 식품의약품안전처로부터 인체피부모형을 이용한 피부자극시험에 대해 국내 최초로 비임상시험실시기관 지정을 받은 바 있다. 본래 비임상시험은 임상시험의 전단계에서 동물을 이용하여 시험제품에 대한 안전성과 효능을 평가하는 시험들이 주를 이루고 있으므로, 동물대체시험에 비임상시험관리기준을 적용하는 것에 대한 선례가 없는 상황이라 준비 단계에서 많은 어려움을 겪은 바 있다. 하지만 현재는 식품의약품안전처에서 동물대체시험으로 *in vitro* 3T3 NRU 광독성시험, 피부감작성시험:국소 림프절시험(BrdU-ELISA) 및 인체피부모형을 이용한 피부자극시험에 대해서 기타 국제적으로 인정하는 시험 항목으로 비임상시험실시기관을 지정한 상태이며 향후 동물대체시험에 대한 관심과 수요가 증가함에 따라 동물대체시험에 대한 GLP 인증 시험 항목과 비임상시험실시기관의 지정이 지속적으로 늘어날 것으로 보인다. 이에 발맞춰 식품의약품안전평가원 한국동물대체시험법검증센터 (KoCVAM)에서는 동물대체시험 가이드라인을 지속적으로 발표하고 있다. 향후 동물대체시험이 보다 활성화되고 시장 규모가 커질 수 있

도록 이러한 노력이 계속해서 이어지길 기대해본다.

결론 및 고찰

최근 가슴기 살균제로 인해 많은 인명 피해가 발생한 예에서도 알 수 있듯이 화학물질에 대한 독성 및 안전성에 대한 정확한 예측은 매우 중요한 요소이며 앞으로도 그 중요성이 더욱 부각될 것으로 보인다. 이를 위해서 기존의 연구자들은 수많은 동물의 희생이 불가피 한 것으로 여기고 실험동물에 대한 복지는 등한시 할 수 밖에 없었으나 동물실험은 극심한 고통을 수반하게 되고 동물실험 결과가 인체시험에서의 결과와 상통하지 않는 경우도 존재하였기 때문에 이를 대체할 수 있는 동물대체시험의 개발은 필수적이라 할 수 있다. 동물대체시험은 실험동물의 수를 줄이거나, 고통을 경감하는 것, 동물을 사용하지 않거나, 발생학적으로 하등한 동물로 대체하여 실험하는 3R (Reduction, Refinement, Replacement)의 원칙하에 개발 및 발전되었다 (안일영 등, 2016). 이러한 차원에서 그동안 토끼를 이용하여 평가했던 피부자극시험을 인체의 표피 조직과 유사하게 3차원적으로 재구성한 인체피부모형으로 대체하는 것은 훌륭한 대안이 될 수 있을 것이다. 또한 인체피부모형을 이용하여 피부자극을 예측함에 있어 보다 객관적이고 정확하게 시험을 수행하기 위해서는 모든 시험절차를 비임상시험관리기준과 같은 규제과학에 준하여 진행하는 것이 필수적이다. 이에 따라 본 기관에서는 수년간의 준비과정을 통해 식품의약품안전처로부터 인체피부모형을 이용한 피부자극시험에 대해 비임상시험실시기관으로 지정받은 바 있으며 이를 통해 피부의 자극여부를 알 수 없는 시험물질에 대해 동물을 사용하지 않고도 자극 여부를 정확하고 신뢰성 있게 예측할 수 있는 체계를 구축하였다. 향후 다양한 동물대체시험에 비임상시험관리기준이 적용되어 화장품 독성 분야의 신뢰성 있는 시험결과가 확보되어야 할 것으로 보인다.

참고문헌

- 비임상시험관리기준, 품의약품안전처 고시 제 2014-67호. 기능성화장품 심사에 관한 규정, 식품의약품안전처 고시 제 2015-14호.
- 비임상시험관리기준 해설서 (2014.), 식품의약품안전평가원, OECD (2004). In vitro skin irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method, OECD guideline for the testing of chemicals No. 439, OECD, Paris,
- OECD (2004). Acute Dermal Irritation/Corrosion, OECD

- Guideline for the Testing of Chemicals No. 404, OECD, Paris.
- OECD (2015). In vitro Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER), OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 430, OECD, Paris.
- OECD (2016). In vitro skin corrosion: reconstructed human epidermis (RHE) test method, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 431, OECD, Paris
- OECD (2015). In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 435, OECD, Paris.
- 안일영, 이윤경, 노종윤, 김태성, 이정선, 고경육, 김주환. (2014). 화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인 (V). 인체피부 모델을 이용한 피부자극시험법, 식품의약품안전평가원
- 손수정. (2016). 인체피부모델을 이용한 피부자극시험법 소개, FDC 법제연구 제 11 권 제 1 호, 55-64.
- European center for the validation of alternative methods (ECVAM) (2007). Performance standards for in vitro skin irritation test methods based on reconstructed human epidermis (RhE),
- European center for the validation of alternative methods (ECVAM). (2008). Statement on the validity of in vitro tests for skin irritation.
- SkinEthic™ RHE. SOP, Version 2.0. (2009) SkinEthic Skin Irritation Test-42bis Test Method for the Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals: 42 Minutes Application + 42 Hours Post-Incubation.
- 김민지, 김배환. (2013). 인공피부모델 KeraSkin™을 이용한 삼황사심탕의 피부자극 평가, 한국동물실험대체법 학회지 7: 5~9.