

화장품 독성시험 가이드라인(I)

- 반복투여 독성시험

2010. 11.



I. 서론

1. 배경

식품의약품안전청에서는 화장품의 안전성 관리 및 평가에 있어 업계 및 제반 관련자에게 도움을 주고자 화장품의 반복투여독성 가이드라인을 제정하게 되었다.

2. 목적

가. 화장품의 반복투여 독성 시험 가이드라인을 제시함으로써, 화장품 안전성 확립에 기여하고,

나. 화장품업계 및 관련 검사기관에서의 안전성 평가에 도움을 주고자 한다.

II. 시험방법

1. 개요

경피반복투여 독성시험은 한정된 기간동안 경피로 반복노출 되어 발생할 수 있는 건강 유해성에 대한 정보를 제공해 준다. 시험물질은 농도별로 여러 동물시험군의 피부에 매일 적용되는데 군당 한 가지 용량으로 90일간 이루어진다. 투여기간동안 동물들은 독성증상 관찰이 매일같이 이루어진다. 시험기간 중 사망동물은 부검되고 최종적으로 생존 동물들은 부검된다.

2. 용어정의

이 가이드라인에서 사용하는 용어의 정의는 다음과 같다.

아만성 경피독성(Subchronic dermal toxicity) : 일생의 일부분(10%를 초과하지 않음) 동안 실험동물에 화학물질을 매일 경피로 노출시킨 결과 발생하는 부작용이다.

용량(dose) : 피부에 적용된 시험물질의 양이다. 용량은 질량(g, mg) 또는 시험동물체중 당 시험물질의 질량(예 : mg/kg)으로 표현된다.

무해용량(No-effect level/No-toxic-effect level/No-adverse-effect level) : 시험물질을 시험동물에 투여하였을 때 시험동물에 어떠한 독성증상도 나타나지 않을 것으로 기대되는 최대용량을 말한다. 무해용량은 시험동물체중 당 매일 투여된 시험물질의 질량(mg/kg/day)으로 표현된다.

축적독성(cummulative toxicity) : 감수성이 높은 조직에서 시험물질 또는 그 대사물에 의한 지연작용 또는 농도 증가의 결과로 발생하는 반복투여의 부작용이다.

3. 시험준비

건강하고 성숙한 동물을 시험 전에 5일 이상 실험실 조건에 순화시킨다. 시험 전에, 동물은 무작위로 분리하여 시험군과 대조군으로 배정한다. 시험 직전에 시험동물의 등 부위 털을 제거한다. 면도도 가능하지만 이는 시험 약 24시간 전에 수행되어야 한다. 추가적인 제모나 면도는 보통 1주일 간격으로 수행된다. 제모 및 면도 시에 피부투과성에 영향을 미칠지 모르기 때문에 피부손상이 없도록 주의를 기울인다. 시험물질 적용을 위해서 체표면적의 10%

이상을 제모 하여야 한다. 제모부위 면적 및 도포 면적 결정 시에는 시험동물 체중도 고려되어야 한다. 고행상 시험물질은 가능하면 가루로 하고 물이나 기타 적절한 매개물질을 사용하여 도포하며, 물 또는 매개물질은 피부와 잘 접촉할 수 있도록 충분한 양이 공급되어야 한다. 이 매개물질은 피부투과에 대한 영향도 고려하여 선택되어야 한다. 액상시험물질은 일반적으로 희석하지 않고 사용한다.

4. 시험동물

1) 동물선정

성숙한 랫드, 토끼 혹은 기니피그가 사용가능하다. 다른 종이 사용될 수도 있지만 정당한 사유가 있어야 한다. 시험을 시작할 때 적절한 동물의 체중범위는 아래와 같이 권고된다.

랫드 : 200 ~ 300 g, 토끼 : 2.0 ~ 3.0 kg, 기니피그 : 350 ~ 450 g

아급성 경피시험이 장기시험의 예비시험으로 수행될 경우에는 동일 종(species) 및 품종(strain)의 실험동물을 사용하여야 한다.

2) 사육 및 식이

실험동물은 개별 케이지에서 사육되어야 한다. 사육실의 온도는 설치류는 22°C (\pm 3°C), 토끼는 20°C (\pm 3°C) 이고, 상대습도는 30 ~ 70 % 이어야 한다. 인공조명을 사용할 경우에는 12시간 간격으로 명/암 주기로 설정한다. 먹이는 상용 실험용 사료를 사용하며 음수는 자유롭게 마실 수 있도록 공급한다.

5. 시험조건

1) 투여용량

대조군 및 적절한 매개물질 대조군을 포함하여 최소 3개의 용량단계를 사용한다. 대조그룹의 동물은 시험물질 처치만 빼고 시험군의 동물과 동일한 방법으로 다루어져야 한다. 최고 투여 용량은 독성효과는 발현되지만 평가에 방해가 될 정도의 사망이 발생하지 않아야 한다. 최소 투여 용량은 독성이 발현되지 않아야 한다. 인체에 노출 추정량이 있을 경우에는 최소 투여 용량은 이 농도를 초과해야 한다. 한 농도 이상의 중간 단계 투여 용량을 사용할 경우에는 투여용량은 독성영향이 단계적으로 나타날 수 있도록 하는 용량

간격이어야 한다. 결과에 유의미한 평가가 가능하기 위해서는 저용량 및 중간용량 그룹과 대조군의 사망발생률은 낮아야 할 것이다.

만약 적용된 시험물질이 심각한 피부자극을 초래한다면, 고농도에서 다른 독성영향이 없어지거나 줄어들더라도 그 농도를 줄여야만 한다. 그러나, 시험초기에 심각한 피부손상이 나타난다면 그 시험은 중단하고 낮은 농도에서 새로운 시험을 수행해야 한다.

2) 한도시험

만약 1,000 mg/kg 이상의 (예상되는 인체노출 용량에 따라 더 높은 용량을 필요로 할 수 있음) 단일용량 시험에서 이 가이드라인에서 기술된 시험과정을 사용했을 때 독성효과가 발생되지 않았고, 관련된 물질이 구조적으로 독성이 예상되지 않는다면 3가지 투여용량단계를 이용하는 시험이 반드시 고려될 필요는 없다.

3) 관찰

면밀한 임상증상 조사가 하루에 한 번 이상 한다. 시험을 위한 동물 손실을 최소화하기 위한 적절한 조치가 (예를 들면 죽은 동물을 발견했을 경우 부검이나 냉동보관, 약하거나 빈사상태인 동물의 격리 또는 도살) 매일 실시되어야 한다.

6. 시험절차

이상적으로 시료는 90일의 시험기간 동안 매일 하루에 6시간 이상 도포한다. 그러나, 실제적인 상황을 고려해서 1주일에 5일 적용하는 것은 수용가능한 것으로 고려할 수 있다. 추가관찰을 위해 계획된 회복군의 동물은 회복되는 양상이나 독성영향이 지속되는 것을 감지하기 위해 처치 없이 28일 이상 유지한다.

시험물질은 체표면적의 약 10%가 되도록 균등하게 도포되어야 한다. 높은 독성의 물질은 적게 도포할 수 있으나 가능한 도포부위는 얇고 균질한 형태로 도포되어야 한다.

시험물질은 도포 후 성긴 거즈드레싱과 비자극성 테이프를 이용하여 고정시킨다. 시험물질과 거즈의 고정을 위하여 시험부위는 적절한 방법으로 덮어줘야 하고 동물이 시험물질을 섭취하지 않도록 해야 한다. 고정을 위해 사용되는 물질은 시험물질을 섭취는 막아주지만 완전하게 움직이지 않는 형태는

권장되지 않는다.

발병시간 및 정도와 지속기간을 포함하는 독성 증상이 기록되어야 한다. 호흡기, 순환계, 자율 및 중추신경계, 체성운동 활동 및 행동유형을 포함하여 피부와 털, 안구 및 점막의 변화를 포함하여 제한 없는 근접한 관찰 결과가 포함된다. 주간으로는 사료 섭취량과 체중을 측정한다. 서로 살육하거나, 조직의 분해 등으로 인한 시험동물의 손실을 막기 위하여 정기적인 관찰이 필요하다. 시험이 종결되었을 때 회복군을 제외한 모든 생존동물은 도살하여야 하고, 빈사상태의 동물은 격리되고 통보한 후에 도살하여야 한다.

7. 임상검사

다음의 검사가 수행되어야 한다.

1) 검안경이나 이에 상응하는 알맞은 기구를 사용하여, 적어도 고용량군 및 대조군을 포함한 적절한 모든 동물에서 점막검사가 시험물질 도포전과 시험 종료시에 수행되어야 한다. 만약 안구의 변화가 관찰된다면 모든 동물에서 실시한다.

2) 적혈구용적률, 헤모글로빈 농도, 적혈구수, 총 및 분화된 백혈구수를 포함한 혈액학적 검사와 응고시간, 프로트롬빈시간, 트롬보플라스틴 시간 또는 혈소판수와 같은 혈액응고 능력 수단이 시험 종료시에 조사한다.

3) 혈액생화학적 검사는 시험 종료시에 수행한다. 모든 연구에서 적절한 것으로 고려되는 시험분야는 전해질 밸런스, 탄수화물 대사, 간과 신장 기능이다. 그 외 특정시험의 선별은 물질의 작용단계에 영향을 받을 수 있다. 제안된 검사항목은 칼슘, 인, 염화물, 소듐, 칼륨, 공복 혈당(동물종에 따라 적절한 공복기간 적용), 혈청 글루타믹-피루빅트랜스아미나제(ALT), 혈청 글루타믹-옥살로세틱트랜스아미나제(AST), 오르니틴디카르복실라아제, 감마글루타밀트랜스펩티다아제, 요소, 알부민, 크레아티닌, 총 빌리루빈과 총 혈장 단백질 지수이다. 적절한 독성평가를 위해 필요한 다른 검사항목들은 지방, 호르몬, 산/염기 밸런스, 메타헤모글로빈, 콜린에스터라아제 활성이다. 필요시 관찰된 효과의 정도를 조사하기 위한 혈액 생화학적 검사가 추가될 수 있다.

4) 소변검사는 기본적인 검사항목으로 요구되지는 않지만, 독성이 예상되거나 관찰될 경우 수행할 필요가 있다.

만약 배경 기준자료가 불충분하다면 투여 시작되기 전에 혈액화적이고 임상 생화학적인 지표에 대한 결정이 고려되어야 한다.

8. 병리

1) 육안병변

모든 동물들의 외관, 구멍, 두개, 흉강, 복강 및 그 부속기에 대하여 전체적으로 육안병변이 관찰되어야 한다. 간, 신장, 부신 및 정소는 건조되기 전에 가능한 신속히 무게를 측정해야 한다. 다음의 장기와 조직은 추후 병리조직학적 검사를 위하여 적절히 보존되어야 한다 ; 모든 육안병변, 뇌(수질, 뇌교 포함), 대뇌 및 소뇌 피질, 뇌하수체, 갑상선/부갑상선, 흉선, (기관(氣管)), 폐, 심장, 동맥, 타액선, 간, 비장, 신장, 부신, 췌장, 생식선, 부속 생식기, 담낭(존재 시), 식도, 위, 십이지장, 공장, 회장, 맹장, 결장, 직장, 방광, 대표적인 림프절, (암컷 유선), (대퇴근), 말초신경, (안구), (골수 포함 흉골), (대퇴-관절면 포함), (척수-경부, 흉부 및 요부), (눈물선). (괄호 속에 언급된 조직들은 독성증상이 나타났거나 표적장기일 경우 검사될 필요가 있다).

2) 조직병리

- (a) 모든 조직병리는 정상피부 및 도포한 피부와 대조군과 고농도군 전체의 장기 및 조직에서 수행되어야 한다.
- (b) 관찰된 병변은 모두 검사되어야 한다.
- (c) 다른 용량군의 표적장기는 검사되어야 한다.
- (d) 랫드가 사용됐을 때, 저농도 및 중농도군 동물의 폐는 감염 증거에 대한 조직병리학적 검사가 제공되어야 한다. 이는 동물의 건강상태를 평가 편의성을 제공한다. 추가적인 조직병리학적 검사는 일반적으로 요구되지 않지만, 고농도군에서 소견이 관찰되는 기관에 대해서는 항상 수행되어야 한다.
- (e) 회복군이 있을 때, 조직병리는 다른 투여군에서 영향이 관찰되는 조직 및 장기에서도 수행되어야 한다.

III. 결과보고

1. 결과의 처리

데이터는 표로 정리되고 이 표는 시험시작 시의 그룹 당 동물 수, 병변을 보이는 동물 수, 병변 유형과 각 병변 유형을 보이는 동물의 퍼센트를 포함한다.

모든 관찰 결과는 적절한 통계방법으로 평가되어야 한다. 일반적으로 받아들여지는 통계방법이 사용가능하며 통계 방법은 시험 설계 기간에 선정되어야 한다.

2. 결과평가

시험결과는 시험기간 중 발견된 사실과 함께 관찰된 독성효과, 부검 소견 및 조직병리학적 소견을 연계해서 평가되어야 한다. 평가는 시험물질의 용량과 행동·임상증상 이상, 육안병변, 확인된 표적장기, 체중변화, 사망률, 다른 일반적이거나 특수한 독성영향을 포함한 비정상 소견 유무와의 관련성 및 심각한 증상 발생빈도를 포함한다.

3. 시험보고

시험보고서는 다음의 정보를 포함하여야 한다.

- 사용된 동물의 종/품종
- 성별 및 용량별 독성반응 자료
- 시험 중 사망시간 혹은 종료 시 생존률
- 독성 혹은 다른 영향
- 이상반응 및 차후의 진행사항의 관찰 시간
- 식이 및 체중자료
- 혈액학적 검사 결과 및 관련 기초자료 등
- 임상생화학 시험 결과 및 관련 기초자료 등
- 부검소견
- 모든 조직병리학적 소견 상세 기술
- 결과 통계처리

4. 결과해석

이 시험은 시험물질을 피부로 반복노출 했을 때의 영향에 대한 정보를 제공할 것이다. 시험결과를 인체로 외삽하는 것은 제한적으로 유효하다. 그러나 시험물질 경피흡수 정도, 무영향량 및 허용 가능한 인간 노출 정도에 대한 유용한 정보를 제공할 수 있다.

IV. 참고문헌

1. OECD Guideline for testing of Chemicals "Subchronic Dermal Toxicity :

90-day Study" 1981

2. WHO Publications: Environmental Health Criteria No. 6, Principles and Methods for Evaluating the toxicity of chemicals. Part I. Geneva, 1978.
3. United States National Academy of Sciences, Committee for the Revision of NAS publication 1138, Principles and Methods for Evaluating the toxicity of Household substances, Washington, 1977.
4. Draize, J.H., The Appraisal of chemicals in food, drugs and cosmetics, 26-30. Association of food and drug officials of the United States, Austin, Texas, 1959.
6. Hagan, E.G., The Appraisal of safety of chemicals. Appraisal of chemicals in food, drugs and cosmetics, 17-25. Association of food and drug officials of the United States, Topeka, Kansas, 1965.