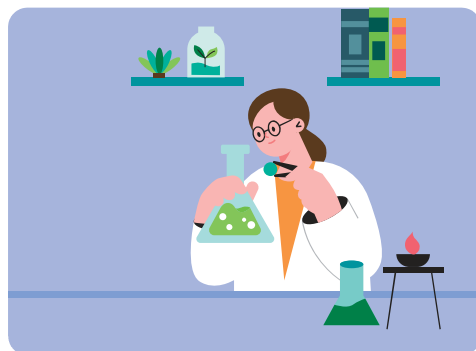




화장품 등 피부흡수 동물대체시험법 가이드라인

생체의 피부흡수시험법(Skin Absorption: *in vitro* Method)

2023. 5.



지침서 · 안내서 제 · 개정 점검표

명칭

화장품 등 피부흡수 동물대체시험법
(생체외 피부흡수시험법, Skin Absorption: *in vitro* Method)
가이드라인(민원인 안내서)

아래에 해당하는 사항에 체크하여 주시기 바랍니다.

등록대상 여부	<input type="checkbox"/> 이미 등록된 지침서 · 안내서 중 동일 · 유사한 내용의 지침서 · 안내서가 있습니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input checked="" type="checkbox"/> 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 기존의 지침서 · 안내서의 개정을 우선적으로 고려 하시기 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"/> 일회성 지시 · 명령에 해당하는 내용입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 외국 규정을 단순 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
	<input checked="" type="checkbox"/> 상기 사항 중 어느 하나라도 '예'에 해당되는 경우에 지침서 · 안내서 등록 대상이 아닙니다. 지침서 · 안내서 제 · 개정 절차를 적용하실 필요는 없습니다.	
지침서 · 안내서 구분	<input type="checkbox"/> 행정사무의 통일을 기하기 위하여 내부적으로 행정사무의 세부 기준이나 절차를 제시하는 것입니까? (공무원용)	<input type="checkbox"/> 예(☞지침서) <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 민원인들의 이해를 돕기 위하여 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 설명하거나 특정 민원업무에 대한 행정기관의 대외적인 입장을 기술하는 것입니까? (민원인용)	<input checked="" type="checkbox"/> 예(☞안내서) <input type="checkbox"/> 아니오
기타 확인 사항	<input type="checkbox"/> 상위 법령을 일탈하여 새로운 규제를 신설 · 강화하거나 민원인을 구속하는 내용이 있습니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input checked="" type="checkbox"/> 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 상위법령 일탈 내용을 삭제하시고 지침서 · 안내서 제 · 개정 절차를 진행하시기 바랍니다.	
상기 사항에 대하여 확인하였음.		
2023년 5월 2일		
	담당자 확 인(부서장)	강 남 희 이 윤 속

이 안내서는 화장품 등 피부흡수 동물대체시험법(생체외 피부흡수시험법, Skin Absorption: *in vitro* Method) 가이드라인에 대하여 알기 쉽게 설명하거나 식품의약품안전처의 입장을 기술한 것입니다.

본 안내서는 대외적으로 법적 효력을 가지는 것이 아니므로 본문의 기술 방식(‘~하여야 한다’ 등)에도 불구하고 참고로만 활용하시기 바랍니다. 또한, 본 안내서는 2023년 5월 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 민원인들의 이해를 돕기 위하여 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 설명하거나 특정 민원업무에 대한 행정기관의 대외적인 입장을 기술하는 것(식품의약품안전처 지침서등의 관리에 관한 규정 제2조)

※ 본 안내서에 대한 의견이나 문의사항이 있을 경우 식품의약품안전평가원 특수독성과에 문의하시기 바랍니다.
전화번호: 043-719-5153, 5155
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.)
3	안내서-0750-02	2023. 5.	화장품 등 피부흡수 동물대체시험법 (생체외 피부흡수시험법, Skin Absorption: <i>in vitro</i> Method) 가이드라인(민원인 안내서) 개정 - 해설문 추가 마련

목 차

화장품 등 피부흡수 동물대체시험법
(생체의 피부흡수시험법, Skin Absorption: *in vitro* Method)
가이드라인



I. 해설문	1
1. 개요	1
2. 시험원리	1
3. 제한점 및 고려사항	2
4. 시험방법	3
5. 데이터 및 기록	9
6. 시험보고서	9
II. 번역문	11
III. 원문	22

I

해설문

1 ▶ 개요

생체의 피부흡수시험법(Skin Absorption: *in vitro* Method)은 시험조제물 속 시험물질이 피부제작물에 흡수된 정보를 제공하는 시험법이다. 본 시험법은 인체 피부 또는 다른 동물 종의 피부를 사용할 수 있고 시험물질에 대하여 반복 측정이 가능하며, 모든 상황에 적용할 수는 없지만 사용할 수 있는 시험물질의 범위가 넓다. 또한 살아있는 실험동물을 사용하지 않고 시험물질의 노출조건에 따른 연구가 가능하므로 생체내(*in vivo*) 시험의 한계 및 윤리적 측면으로부터 자유로울 수 있다는 장점이 있다.

생체의 피부흡수시험은 시험조제물의 구성에 따른 피부흡수와 투과를 비교할 수 있어, 인체 내 피부흡수에 의한 위험성 평가 등에 유용한 모델로 사용될 수 있다.

2 ▶ 시험원리

본 시험법은 시험조제물 속 시험물질이 피부에 노출되면 침투 및 확산되어 피부에 흡수되는 원리를 이용한 것으로, 인체 노출을 모방하여 시험조제물을 적용해야 한다. 피부투과장치(Diffusion cell)에 고정시킨 피부제작물(skin preparations) 표면에 시험조제물을 적용한 후 피부제작물 아래 회수칸(receptor chamber)의 회수액(receptor fluid)을 정해진 시간 간격으로 채취하여 회수액과 시험물질이 적용된 피부제작물을 분석함으로써 피부흡수 프로파일을 확인하는 시험법이다.

정해진 양의 시험물질을 노출시킨 경우 피부제작물에서 세척된 양, 피부에 흡수된 양(가능하다면 피부 각 층에서의 잔존량)과 회수액에 존재하는 양(시간에 따른 비율, 절대값 혹은 노출량에 대한 백분율 값)을 계산하며, 무제한 용량일 경우 투과상수(permeability constant, K_p)로 흡수율을 계산하여 피부흡수 프로파일을 통해 피부흡수도를 평가한다.

3 ▶ 제한점 및 고려사항

본 시험법의 시험계로는 생리활성이 있는 갓 채취한 피부가 선호되지만 생리활성이 있는 피부를 항상 쉽게 구할 수 있는 것은 아니다. 피부의 주요한 확산 장벽은 죽은 각질층(*stratum corneum*)이기 때문에 피부의 투과 특성은 몸에서 채취된 이후에도 유지되지만, 피부를 통한 화학물질의 활발한 이동은 확인되지 않았다. 피부는 경피 흡수 동안 일부 화학물질을 대사할 수 있는 능력이 있는 것으로 나타났다. 피부의 무결성이 입증될 수 있는 경우, 생리활성이 없는(non-viable) 피부를 사용하여 시험물질의 확산만을 측정할 수 있으며 생리활성이 있는 갓 채취한 피부를 사용하여 시험물질의 확산과 함께 피부대사를 동시에 측정할 수 있다. 이는 다양한 제형의 화학물질이 피부에 침투 및 투과되어 전달되는 것을 비교하는 스크리닝 시험법으로 사용되거나 인체 피부를 통한 화학물질의 흡수를 평가하는 유용한 모델이 될 수 있다.

본 시험법은 모든 상황 및 모든 등급의 화학물질에 적용할 수 있는 것은 아니다. 피부투과와 초기 정량적 평가를 위한 방법으로 사용 가능하나, 더 자세한 평가가 필요한 경우 생체내(*in vivo*) 시험 결과도 함께 고려해야 한다.

◦ GD28(피부흡수시험법의 수행을 위한 지침서, 시험 및 평가에 대한 OECD 문서 제28호)

9. 생체의 시험법은 말초혈액흐름(peripheral blood flow)의 싱크조건(sink condition)을 완전히 재현할 수 없다는 제한점을 가진다. 그러나 피부 흡수는 원래 수동적으로 발생하는 과정이며, 적절한 생체의 실험조건을 이용하여 수행된 연구는 이러한 생체외 시험법의 유용성을 증명하는 광범위한 물질에 대한 데이터를 생산하였다. 이들 생체외 시험법은 다양한 제형의 화학물질의 피부 전달을 비교하는 등에 사용되고 있으며, 인체 피부흡수로 인한 위해성 평가의 유용한 모델이 될 수 있다.
10. 생체내 및 생체외 시험법의 사용은 평가되어야 하는 상황에 따라 달라질 수 있다. 생체내 시험결과는 단독으로 사용될 수 있다. 하지만 시험물질의 사용 목적에 따라 피부 투과 (skin penetration)의 초기 평가를 위해 생체외 시험만을 수행하는 것이 가능할 수 있다. 피부흡수를 더욱 정교하게 평가할 필요가 있는 경우 생체외와 생체내 시험결과를 함께 고려할 수 있다.
12. 시험을 수행하는 실험실에서 사용하는 시험계의 성능과 신뢰성을 입증할 수 있는 관련 참고시험물질의 시험결과가 있어야 하며, 이는 사용하는 시험법에 대해 발간된 학술논문 결과와 일치해야 한다. 그렇지 않은 경우 적절한 참고시험물질(시험물질과 유사한 친유성을 가진 물질 권장)을 시험물질과 동시에 시험하거나, 친유성이 다른 다수의 참고시험물질에 대한 적절한 과거 데이터를 제시함으로써 충족할 수 있다. 생체내 및 생체외에서 많이 시험된 참고시험물질의 예시로는 카페인(log P_{ow} 0.01), 벤조산(log P_{ow} 1.83) 및 테스토스테론(log P_{ow} 3.32)이 있다.

4 ▶ 시험방법

4.1. 시험준비

1) 피부투과장치(Diffusion cell)

피부투과장치는 시험물질 적용칸(donor chamber)과 시험물질 회수칸(receptor chamber)으로 구성되어 있고 이 사이에 피부를 고정한다. 피부투과장치는 피부제작물을 잘 밀착시키고 피부제작물 아래쪽의 회수액을 균질하게 혼합시킬 수 있어야 한다. 또한, 회수액의 채취가 용이하고, 피부투과장치와 내용물의 온도 조절이 용이해야 한다. 시료의 확산시스템은 정적(static) 또는 동적(flow-through) 확산시스템 모두 사용이 가능하다. 시험물질 적용칸의 윗부분은 피부가 시험물질에 노출되는 동안 열린 상태로 두는 것이 일반적이나, 특정한 목적이 있다면 닫아둘 수도 있다.

○ GD28(피부흡수시험법의 수행을 위한 지침서, 시험 및 평가에 대한 OECD 문서 제28호)

22. 동일한 시험에 사용하는 각 장치는 0.3~5 cm² 범위 내에서 동일한 표면적을 가져야 한다. 준비된 피부는 각질층(stratum corneum)이 위로 위치하도록 하여 피부투과장치에 고정한다. (생략) 피부투과장치는 시험물질과 반응을 최소화하기 위해 유리나 폴리테트라플루오로에틸렌(Polytetrafluoroethylene; PTFE)과 같은 비활성 물질로 만들어진 장치를 이용한다.
61. 정상적인 노출 방법을 고려하여 장치를 개폐할 수 있다. 개방형 장치는 시험물질 중 휘발성분이 증발할 수 있다. 또한, 정상적인 건조과정이 있으므로 피부 수화에 의한 피부 구조 손상을 피할 수 있다.

2) 시험물질 회수액(Receptor fluid)

(1) 회수액의 선택

회수액은 피부조직에 손상을 일으키지 않는 것을 사용하는 것이 좋으며, 시험물질의 용해도를 고려하여 선택한다. 또한 회수액이 피부제작물의 무결성(integrity)에 영향을 주지 않아야 한다.

○ GD28(피부흡수시험법의 수행을 위한 지침서, 시험 및 평가에 대한 OECD 문서 제28호)

24. 생리활성이 없는 피부를 이용하여 수용성 물질을 평가하는 경우, 회수액은 보통 pH 7.4의 생리식염수 등을 사용한다. 소수성 시험물질을 평가하는 경우, 에탄올:물 혼합액(1:1) 또는 물에 용해한 6 % 폴리에틸렌글리콜20올레일에테르(polyethylene glycol 20 oleyl ether) 등과 같은 유기용매를 사용할 수 있다.
25. 생리활성이 있는 피부를 사용하는 경우, 조직배양배지 등과 같은 생리학적 회수액을 선택한다. 비극성 시험물질의 경우 이러한 회수액의 사용이 제한될 수 있는데 회수액에서 시험물질의 용해도가 불충분할 수 있기 때문이다. 이러한 문제는 생리식염수 등에 개선제(modifier)를 추가함으로써 해결할 수 있는데 주로 6 % 폴리에틸렌글리콜 20올레일에테르 또는 5 % 소혈청 알부민이 사용된다.
26. 방사성이 표지되지 않은 시험물질을 평가하는 경우의 회수액은 분석과정을 고려하여 선택한다.

(2) 회수액 교환 및 유속

동적(flow-through) 확산시스템의 경우 유속은 시험물질이 회수액에 공급되는 것을 저해해서는 안 된다. 정적(static) 확산시스템의 경우 액체가 지속적으로 혼합되어 균질한 시료를 채취할 수 있어야 한다.

- GD28(피부흡수시험법의 수행을 위한 지침서, 시험 및 평가에 대한 OECD 문서 제28호)
- 29. 정적 확산시스템에서 회수액의 양(일반적으로 2~20 mL)은 시험물질의 흡수를 제한하지 않을 만큼 충분해야 한다.
 - 30. 동적 확산시스템에서 시험물질 회수간의 회수액 양은 일반적으로 0.1~5 mL이며, 회수액으로의 확산속도가 제한되지 않도록 계속해서 회수액을 보충해주어야 한다.
 - 31. 유속은 일반적으로 3 mL 회수간의 경우 9 mL/hr(시간당 3회 교환)이거나 150~300 μ L 회수간의 경우 1.5 mL/hr(시간당 5~10회 교환)이다. 유속을 더 낮추는 것(예: 교환하지 않거나 시간당 1회 교환)이 때때로 적절할 수 있는데, 방사성이 표지되지 않은 물질을 평가하거나 회수액 내 시험물질의 양이 낮아 분석이 어려울 때 특히 그러하다.

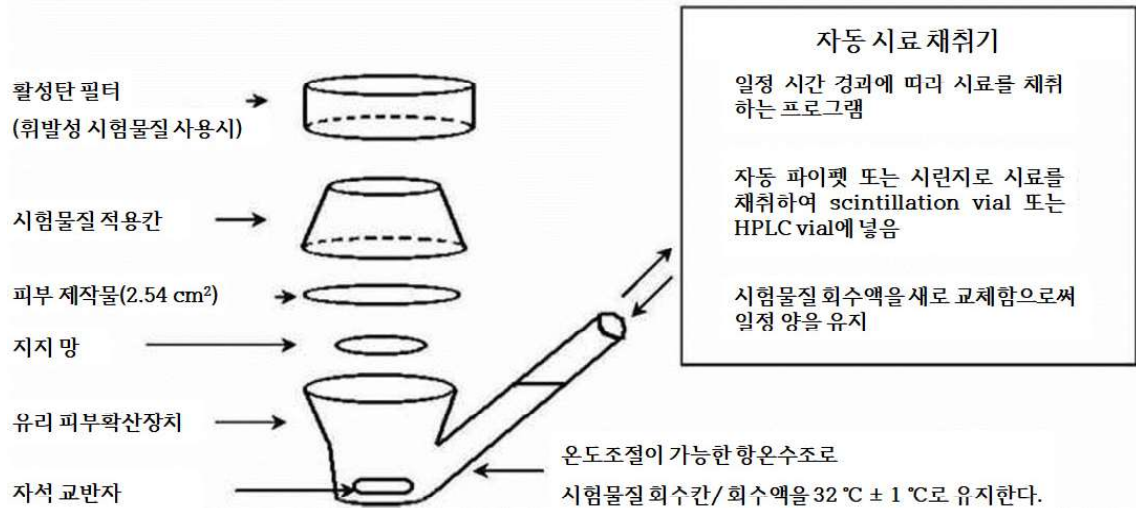


그림1. 생체의 피부흡수시험을 위한 정적 확산장치의 예

3) 생리활성의 유지

피부 대사를 시험하고자 할 때에는 갓 채취된 피부를 가능한 한 빠르게 사용하여야 하고, 피부 생리활성을 유지할 수 있는 조건하에서 시험을 진행하여야 한다.

○ GD28(피부흡수시험법의 수행을 위한 지침서, 시험 및 평가에 대한 OECD 문서 제28호)

32. 피부투과는 수동확산 과정이므로, 방사성 표지물질의 피부흡수를 평가할 때 생리활성을 고려하지 않아도 좋다. 그러나 일부 화합물의 경우 전신 흡수에 앞서 피부 내에서의 생리적 변성(biotransformation)이 발생할 수 있다. 생리활성의 유지가 필요한 시험의 경우(예: 대사체 식별이 요구되는 경우 등) 시험기간 동안 적절한 생리활성이 유지되는지 확인해야 한다.
33. 공여 대상으로부터 피부가 채취되면 생리활성의 변화가 발생할 수 있다. (생략) 피부 활성(skin viability)의 지표로써 가장 널리 사용되는 것은 포도당의 이용(glucose utilization)인데, 이는 에너지 대사가 생리활성의 무결성에 대단히 중요하기 때문이다.
34. 생체외 대사의 정도는 생리활성이 있는 조직층(일반적으로 표피)에서 시험물질이 잔류하는 시간(residence time)에 따라 달라진다. 시험물질의 잔류시간이 길어질수록 신진대사가 증가한다.

4) 피부 준비

피부는 시험에 적합한 상태로 준비되어야 한다. 취급하는 과정에서 각질층의 손상이 발생할 수 있으므로, 시험 전 반드시 피부의 상태를 점검해야 한다. 인체 또는 동물 유래 피부를 사용할 수 있다. 생리활성이 있는 피부가 좋지만, 피부제작물의 무결성을 증명할 수 있는 경우 생리활성이 없는 피부도 사용할 수 있다.

○ GD28(피부흡수시험법의 수행을 위한 지침서, 시험 및 평가에 대한 OECD 문서 제28호)

35. 인체 피부를 통한 피부흡수는 복부나 흉부 피부를 사용하여 평가한다. 돼지 피부를 사용하는 경우 가장 흔히 사용되는 부위는 옆구리와 귀이며, 등과 사지의 피부 또한 자주 사용한다.
36. 랫드의 피부는 등이나 복부 피부가 사용될 수 있지만, 생체내 적용 부위에 상응하는 시험을 설계하는 경우, 등 부위의 피부를 사용해야 한다.
37. 상피조직을 분리하는 방법은 피부의 모양이나 낭의 깊이 등 유전적인 특성을 고려하여 달라질 수 있다. 일반적으로 인체 피부와 돼지 피부는 열을 이용하여 상피를 분리하는데 60 °C에서 1~2분간 반응시킨 후 핀셋을 이용하여 상피를 벗겨낼 수 있다. 랫드 피부에서 상피를 분리할 때에는 주로 화학물질을 이용하는데 2M 소듐브로마이드(2M Sodium bromide)를 사용한다. 프로테아제(Protease) 또는 세균성 콜라게나제(Bacterial collagenase) 등 효소를 이용하여 분리하는 것 또한 효과적이다.
38. 피부채취기를 통해 채취한 200~400 μm 두께의 부분층피부(split-thickness skin)를 일반적으로 사용한다.
39. 전층피부(full thickness skin)를 시험에 사용할 수도 있으나 1 mm 이상의 두꺼운 피부는 시험물질이 피부 전층에 분포하는 경향을 확인하는 목적 외에는 사용하지 않는다.

사용하고자 하는 동물 종, 해부학적 부위와 피부 준비방법은 시험 목적에 적합하여야 하며, 시험조제물 당 최소 4개의 조직반복시료에서 얻은 인정가능한 데이터가 필요하다.

○ GD28(피부흡수시험법의 수행을 위한 지침서, 시험 및 평가에 대한 OECD 문서 제28호)

18. 인체피부모델(reconstituted human skin models)은 참고시험물질의 시험결과가 발간된 참고문헌의 결과와 일치하는 경우 사용 가능하다.

5) 피부의 보관

일반적인 지침에 따르면 갓 채취된 피부는 일반적으로 24시간 내에 사용해야 하지만, 허용되는 저장기간은 신진대사 및 저장 온도와 관련된 효소계에 따라 달라질 수 있다.

○ GD28(피부흡수시험법의 수행을 위한 지침서, 시험 및 평가에 대한 OECD 문서 제28호)

41. 동물 및 인체 유래 피부제작물은 - 20 °C에서 수개월간 보관이 가능하다. (생략) 나중에 사용을 용이하게 하기 위해 보관 전 피하조직을 제거하는 것이 좋다. (생략) 피부조직을 재냉동 및 해동하는 것은 투과성을 증가시킬 수 있으므로 권장하지 않는다. - 80 °C에서 보관한 피부조직은 투과성이 증가하므로 피부를 너무 낮은 온도에 보관하는 것은 적절하지 않다.

6) 피부 구조(장벽)의 무결성

보관된 피부를 시험에 사용할 때에는 시험 전 반드시 무결성 평가를 통해 구조적인 무결성(barrier function)이 입증되어야 한다.

○ GD28(피부흡수시험법의 수행을 위한 지침서, 시험 및 평가에 대한 OECD 문서 제28호)

44. 피부제작물을 평가하는 첫 번째 단계는 물리적 손상 여부를 시각적 검사로 평가하여 적합하지 않은 피부를 제외하는 것이다. 두 번째로 피부제작물을 장치에 고정하고 평형화(equilibrate) 및 수화(hydrate)시킨다.
45. 무결성을 평가하기 위해 다음의 방법 중 하나(a, b 또는 c)를 사용한다.
- a) 시험 전 무결성 평가
 - 최대 2볼트의 교류(alternating current)에 대한 전기저항이 해당 피부 유형의 정상범위 내에 있는지 확인한다.
 - 각질층으로부터의 경피수분손실(trans-epidermal water loss; TEWL)이 해당 피부 유형의 정상범위 내에 있는지 확인한다.
 - 참고시험물질[예: 삼중수소수소(tritiated water)]의 투과특성을 측정하는 것이 적합할 수 있다. 그러나 피부 제작물의 물리적인 저하(실온에서의 시간 및 수화 등을 이유로)로 인해 투과성이 과대측정 될 수 있다.
46. 시험 전 평가는 실제 실험을 수행하기 전 손상된 피부를 제외시킬 수 있다는 장점이 있다. 시험조제물을 적용하기 전 사용된 모든 액체를 제거하여 피부 표면을 건조시키는 것이 중요하다. 피부에 시험용량을 적용하기에 앞서 보통 10분~30분 동안 회수액에서 피부를 평형화해야 한다.
- b) 동시 무결성 평가
47. 시험조제물에 참고시험물질을 추가하여 동시 무결성을 확인할 수 있다. 이는 참고시험물질의 농도가 해당 제제의 열역학에 기여하지 않을만큼 충분히 낮고, 참고시험물질과 시험물질의 log P의 차이가 크지 않다는 전제하에 유용한 방법이 될 수 있다. 실용상의 이유로 모든 시험조제물에 이러한 방법을 적용할 수 있는 것은 아니다.
- c) 시험 후 피부 무결성 평가
48. a)에 기술된 방법은 시험조제물에 노출된 후 수행될 수 있다. 그러나 물리적 세척절차 또는 수화(hydration)/변성(degeneration), 시험 제제의 영향으로 인해 각질층의 무결성이 시험 동안이나 시험 후에 저하될 수 있다. 따라서 시험 후 물리적 평가는 보통 특정한 단기노출시험(예: 모발 케어 제품) 이후에만 적합하다. 시험 후 데이터 분석은 손상되지 않은 세포의 평균 흡수 데이터와의 비교를 통해 손상된 피부제작물을 식별하는데 사용될 수 있다. 손상되지 않은 막과 비교하였을 때 시험물질은 손상된 피부를 더 빠른 속도로 더 많이 투과한다.

7) 시험물질

시험물질이란 피부흡수도를 평가하고자 하는 물질로, 방사성동위원소가 표지된 시험물질이 가장 이상적이다.

○ GD28(피부흡수시험법의 수행을 위한 지침서, 시험 및 평가에 대한 OECD 문서 제28호)

49. 시험물질은 14C와 같이 안정하고, 98 %를 초과하는 방사화학적 순도를 갖는 물질로 표지하여 물질의 분포와 회수율을 측정한다. (생략) 필요한 경우 표지물질은 비표지물질로 희석할 수 있으며 시험물질 고유의 활성과 방사화학적 순도는 반드시 알려져 있어야 한다.
50. 방사성표지시험물질 사용의 장점에도 불구하고 대표적인 시험조제물을 만드는 것이 항상 가능한 것은 아니다 (예: 마이크로캡슐이나 과립형 물질). 나아가 산업용 화학물질 및 이들 중간체(intermediates), 계면활성제, 유기물질 등을 포함한 다수의 경우 방사성표지물질을 합성할 수 없다. 이러한 경우 관련 샘플 내 화학물질을 위한 적절하고 검증된 분석 절차가 있다면 방사성을 표지하지 않은 물질이 사용될 수 있다.

8) 시험조제물

시험조제물(예: 피부에 적용될 시험물질이 들어있는 원물질, 희석 또는 조제된 물질)은 인체 또는 기타 사용하고자 하는 동물 종(target species)에 대한 노출 경로와 유사해야 한다(그렇지 않으면 현실적인 대안 사용). 사용 중인(in-use) 조제물질의 모든 변형은 타당성을 제시해야 한다.

○ GD28(피부흡수시험법의 수행을 위한 지침서, 시험 및 평가에 대한 OECD 문서 제28호)

51. 시험조제물(피부에 적용되는 시험물질을 함유한 실제 제조된 물질)은 인간이나 다른 동물 종이 노출될 수 있는 것과 동일해야 한다(그렇지 않은 경우 현실적인 대안 사용). 시험조제물은 보통 방사선표지된 시험물질을 공조제물(blank preparation, 시험물질이 포함되지 않은 상업적 조제물)과 혼합하여 만든다. 방사선표지된 시험물질은 실제 사용되는 방사선표지되지 않은 시험물질을 잘 대표하도록 조제해야 한다. 적절한 경우 용액 혹은 현탁액을 만들기위해 일반적인 사용에서 권장되는 절차에 따라 시험물질을 희석할 수 있는데 이 경우 보통 물과 희석한다.
52. 분말과 같은 고체는 피부 접착과 시험 용량의 정량적이고 균질한 적용을 돕기 위해 물에 적셔야 한다. 물로 적시는 것은 보통의 실제 사용 조건과 같은 환경적 습도와 땀을 어느정도 모방할 수 있다.
53. 시험조제물 내 시험물질의 안정성과 균질성을 확인할 필요가 있다.

4.2. 온도 및 습도

피부 온도변화는 흡수과정에 영향을 줄 수 있으므로, 장치 중 회수액의 온도는 $32\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 로 일정하게 유지한다. 피부의 온도를 일정하게 유지하기 위해 항온수조나 히팅블록을 사용할 수 있다. 온도계를 사용하여 시험계의 피부나 회수액이 적정온도를 유지하는지 확인한다. 장치의 습도는 30 %~70 %가 적절하다.

4.3. 시험방법

1) 피부적용

일반적인 시험에서는 시험물질의 농도를 한정적으로 적용한다. 고체물질의 경우 피부 cm^2 당 1~5 mg, 액체의 경우 cm^2 당 10 μL 까지 도포한다. 피부 내 최대흡수율을 유지하기 위해 적용하는 물질의 양을 제한하지 않을 수 있다. 도포량은 시험물질의 예상되는 사용조건이나 연구 목적, 시험물질의 물리적 성질을 고려하여 결정한다. 점도가 낮은 물질의 경우 그 양을 줄일 수 있다.

○ GD28(피부흡수시험법의 수행을 위한 지침서, 시험 및 평가에 대한 OECD 문서 제28호)

- 58. 적용량을 제한하지 않는 시험(일반적으로 100 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ 또는 10 mg/cm^2 이상의 양을 적용)의 경우, 일정한 유속, 흡수율, Kp 값을 통해 일정한 피부흡수상태를 유지할 수 있다.
- 59. 균일한 도포를 위해 기구를 사용할 수 있으나, 기구에 남아있는 시험물질의 양은 시험 완료 후 결과 산출에 반영하여야 한다.
- 60. 방사성 표지 시험물질은 피부 1 cm^2 당 ^{14}C 를 37 kBq(1 μCi)로 적용하는 것이 적용 용량의 흡수율을 측정하는데 적절하다.

2) 노출 및 시료채취 기간

시험조제물에 대한 피부 노출은 시험 전 기간 동안 진행하거나 이보다 짧은 기간 진행할 수 있다(예컨대 구체적인 인체 노출 타입을 모방하는 것이 목적인 경우). 적절한 세척 용액을 사용하여 과도한 시험조제물을 피부에서 세척하고 세척 용액은 분석을 위해 회수한다. 시험조제물의 제거 절차는 예상되는 사용조건에 따라 달라지며 타당성이 제시되어야 한다. 피부흡수시험에서 일반적으로 시료채취를 24시간 동안 하여, 검사하고자 하는 시험물질의 피부흡수도를 파악할 수 있는데, 24시간이 경과하면서 피부 상태가 나빠지므로 시료채취 기간은 24시간을 넘기지 않는 것이 좋다. 시험물질의 피부흡수 프로파일을 뚜렷하게 나타낼 수 있도록 시료채취 빈도를 조절할 수 있다.

○ GD28(피부흡수시험법의 수행을 위한 지침서, 시험 및 평가에 대한 OECD 문서 제28호)

- 67. 피부 표면을 세척하면 물질 적용은 종료된다. 피부 노출 시간은 정상적으로 인체에 노출되는 시간과 방법을 고려하여 결정한다. 피부를 세척하는 가장 적절한 방법은 비누를 사용하거나 위생습관을 반영하는 것이다. 천연 스폰지나 면봉은 비누를 사용하는 것과 관련된 기전적 표면접촉을 더 잘 나타내기 위해 권장된다.
- 70. 피부흡수 프로파일을 확인하는 것이 목표이며 이를 위해 시료는 보통 24시간 동안 6회~12회 채취한다.

3) 분석

시험계의 모든 구성 요소가 분석되어야 하며, 회수율이 평가되어야 한다(방사능표지물질의 경우 100 % ± 10 % 회수를 목표로 하며 이를 벗어났을 경우 그 이유를 보고서에 명시한다). 여기에는 시험물질 도포 기구, 시험물질 적용칸, 피부 세척액, 피부, 회수액 및 시험물질 회수칸 등이 포함된다. 경우에 따라 피부를 시험물질 노출부 및 장치 테두리 쪽 피부(비노출 테두리)로 구분하기도 하며, 각질층, 상피 및 진피 부분 등으로 분획하여 분석할 수 있다.

5 ▶ 데이터 및 기록

데이터는 회수액의 분석과 시험계에서 시험물질의 분포와 흡수도가 제시되어야 한다. 정해진 양의 시험물질을 노출시킨 경우 피부에서 세척된 양, 피부에 흡수된 양 (가능하다면 피부 각 층에서의 잔존량)과 회수액에 존재하는 양(시간에 따른 비율, 절대값 또는 노출량에 대한 백분율값)이 계산되어야 한다. 피부투과도는 때때로 회수액 자료만을 가지고 나타내기도 한다. 그러나 시험 종료시에 시험물질이 피부에 남아있다면 이 잔존량을 총 흡수량에 포함할 수 있다. 계산이 불가능한 지속적인 노출의 경우 투과상수(permeability constant, K_p)를 이용하여 흡수율을 계산한다.

6 ▶ 시험보고서

시험보고서에는 시험방법의 적절성과 시험방법 상에 제시되었던 다음의 평가 항목들을 모두 포함하도록 한다.

시험물질

물리적 성상, 물리화학적 특성(최소한 분자량 및 $\text{Log } P_{ow}$), 순도(방사화학적 순도)

- 식별 정보(예: 배치 번호)
- 회수액에서의 용해도

시험조제물

- 제형 및 사용 근거
- 균질성

시험 조건

- 피부 채취 동물의 종 및 부위, 피부 채취 방법, 사용 전 저장 조건, 전처리 방법(세척, 항생제 적용 등), 피부의 무결성 측정값, 대사성, 사용 근거 등
- 투과장치 설계, 회수액 조성, 회수액 유량 또는 시료채취 시간 및 절차
- 시험조제물 적용의 세부 사항 및 적용된 용량의 정량화
- 노출 기간
- 피부에서 시험조제물을 제거하는 방법과 관련한 세부 사항(예: 피부 세척)
- 피부 분석의 세부 사항 및 피부 각 층에서의 흡수도를 평가하기 위한 피부 분절법
- 장치 및 장비 세척 절차
- 분석법, 추출 기법, 분석의 한계 및 분석법 검증

결과

- 시험의 전반적 회수율(적용된 용량 \equiv 피부 세척액 + 피부 + 회수액 + 장치 세척액)
- 장치의 각 부분에서 회수율 분석
- 피부흡수 프로파일
- 도표화된 흡수도 자료(비율, 양 또는 백분율로 표시)

결과에 대한 고찰

결론

II

번역문(OECD TG428)

생체외 피부흡수시험법(Skin Absorption: *in vitro* Method)**서론**

1. 본 시험가이드라인은 채취된 피부에 적용된 시험물질의 흡수에 대한 정보를 제공하기 위해 고안되었다. 본 시험가이드라인은 생체내(*in vivo*) 피부흡수시험법에 대한 OECD 시험가이드라인(OECD Test Guideline for Skin Absorption: *In vivo* Method(1))과 함께 조합하거나 단독으로 수행할 수 있다. 본 시험가이드라인의 적용을 위한 시험 계획의 수립을 위해 피부흡수시험의 수행에 대한 OECD 지침서(OECD Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies(2))를 참고할 수 있다. 해당 OECD 지침서는 본 시험법으로 얻은 결과의 신뢰성을 보장하고 특정 상황에서 사용하기에 적절한 생체외(*in vitro*) 시험 절차의 선정을 돕기 위해 마련되었다.

초기 고려사항

2. 피부흡수와 피부 전달을 측정하는 시험법은 생체내와 생체외 두 개의 분야로 나눌 수 있다. 생체내(*in vivo*) 피부흡수시험법은 잘 확립되어 다양한 동물 종에서 약물동태학적 정보를 제공한다. 생체내 시험법은 별도의 OECD 가이드라인(1)에 설명되어 있다. 생체외 시험법 또한 피부흡수 평가에 수년간 사용되어왔다. 본 시험가이드라인에 포함된 생체외(*in vitro*) 시험법의 공식적인 검증연구는 수행되지 않았지만, OECD 전문가그룹은 1999년 본 시험가이드라인의 생체외 시험법(3)을 뒷받침하기에 충분한 데이터가 평가되었다는 것에 동의하였다. 충분한 양의 생체외 및 생체내 시험 데이터의 직접적인 비교를 포함하여 이러한 근거를 뒷받침할 추가적인 세부 내용은 OECD 지침서(2)에 나와 있다. 이를 이용한 생체외 시험법 사용에 대한 세부 배경 정보를 제공하는 다수의 모노그래프(monograph)가 있다(4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12). 생체외 시험법은 피부를 침투하거나 투과하여 회수칸(fluid reservoir)으로 시험물질이 확산된 것을 측정한다. 생리활성이 없는(non-viable) 피부를 이용하여 시험물질의 확산만을 측정하거나 생리활성이 있는 것 채취한 피부를 사용하여

시험물질의 확산과 피부 대사를 동시에 측정할 수 있다. 이러한 방법은 다양한 제형의 화학물질이 피부에 침투 및 투과되어 전달되는 것을 비교하는 스크리닝 시험법으로 사용되거나 인체 피부를 통한 화학물질의 흡수를 평가하는 유용한 모델이 될 수 있다.

3. 생체의 피부흡수시험법은 모든 상황과 등급의 화학물질에 적용할 수 있는 것은 아니다. 피부투과의 초기 정량적 평가에 생체의 시험법을 사용하는 것이 가능할 수 있다. 일부 경우 생체내 시험결과가 추가적으로 필요할 수 있다. 생체의 시험법의 사용이 적합한 상황에 대한 추가적인 설명은 OECD 지침서(2)를 참고한다. 이러한 결정을 뒷받침할 추가적인 자세한 정보는 OECD 전문가회의 보고서에서 제공된다(3).
4. 본 시험가이드라인은 채취된 피부를 사용한 시험물질의 피부흡수 및 전달 측정의 일반적인 원칙을 제시한다. 인간을 포함한 다수의 포유류 종의 피부가 사용될 수 있다. 피부의 주요한 확산 장벽은 죽은 각질층(*stratum corneum*)이기 때문에 피부의 투과 특성은 몸에서 채취된 이후에도 유지되지만, 피부를 통한 화학물질의 활발한 이동은 확인되지 않았다. 피부는 경피 흡수 동안 일부 화학물질을 대사할 수 있는 능력이 있는 것으로 나타났다(6). 이러한 과정은 혈류로 유입되는 물질의 특성에 영향을 줄 수 있지만 실제 흡수율의 측정에 있어서 제한점이 되는 것은 아니다.

시험의 원리

5. 방사성동위원소로 표지된 시험물질을 피부투과장치의 두 개의 칸(chamber) 사이에 놓인 피부제작물(skin preparations)의 표면에 적용한다. 시험물질은 적절한 세척 절차에 따라 제거하기 전까지 정해진 조건과 시간 동안 피부에 적용한 채로 둔다. 실험을 진행하는 동안 정해진 시간대에 회수액(receptor fluid)에서 시료를 채취하여 시험물질 및(또는) 생리활성을 분석한다.
6. 생리활성이 있는 피부를 사용할 때에는 적절한 방법으로 시험물질의 대사산물(metabolites)을 분석할 수 있다. 적절한 경우, 시험 종료 후 실험물질과 대사산물의 분포(distribution)를 정량화한다.

7. 본 가이드라인 및 동반되는 OECD 지침서(2)에 기술된 적절한 조건으로 회수액 및 물질을 적용한 피부를 분석함으로써 정해진 시간 동안의 시험물질 흡수량을 측정한다. 회수액 값만으로 흡수를 판정할 수 있다는 것이 증명되지 않는 경우, 피부에 남아있는 시험물질은 흡수된 것으로 간주되어야 한다. 다른 요소(피부에서 씻겨나간 물질 및 피부층에 남아있는 물질)를 분석하여 시험물질의 분포(disposition) 및 회수율(%)을 포함한 추가적인 데이터 평가가 가능하다.
8. 시험을 수행하는 실험실에서는 시험계의 성능(performance)과 신뢰성(reliability)을 입증할 수 있는 관련 참고시험물질의 시험결과가 있어야 하며, 이는 사용하는 시험법에 대해 발간된 학술논문과 일치해야 한다. 이러한 요구사항은 적절한 참고시험물질[시험물질과 유사한 친유성 물질(lipophilicity) 권장]을 시험물질과 동시에 시험하거나 친유성이 다른 다수의 참고시험물질(카페인, 벤조산, 테스토스테론 등)에 대한 적절한 과거 데이터를 제시함으로써 충족할 수 있다.

시험법의 정의

피부투과장치(Diffusion cell)

9. 피부투과장치는 시험물질 적용칸(donor chamber)과 시험물질 회수칸(receptor chamber)으로 구성되어 있으며 그 사이에 피부제작물이 고정된다(일반적인 형태의 예시는 그림1에서 제공한다). 피부투과장치는 피부제작물에 잘 밀착하며, 시료채취를 용이하게 하고 피부제작물 아래쪽의 회수액을 균질하게 혼합시킬 수 있어야 하며, 피부투과장치 내의 온도 조절이 가능해야 한다. 피부투과장치는 정적(static) 또는 동적(flow-through) 확산시스템 모두 사용 가능하다. 보통 시험물질 적용칸은 한정된 용량의 시험물질을 적용하는 동안 막지 않은 상태로 둔다. 단, 용량을 무제한 적용하거나 한정된 용량을 사용하는 특정 상황을 연출하는 경우 시험물질 적용칸을 막아 둘 수 있다.

시험물질 회수액(Receptor fluid)

10. 피부조직에 손상을 일으키지 않는 회수액을 사용하는 것이 좋지만 타당한 이유를 제시하는 경우 다른 회수액을 사용할 수 있다. 회수액의 정확한 조성이 제공되어야 한다. 회수액이

흡수의 장벽으로 작용하지 않도록 회수액에서 시험물질의 적절한 용해도가 증명되어야 한다. 또한 회수액이 피부의 무결성(integrity)에 영향을 주지 않아야 한다. 동적(flow-through) 확산시스템의 경우 유속은 시험물질이 회수액에 공급되는 것을 저해해서는 안 된다. 정적(static) 확산시스템의 경우 액체가 지속적으로 혼합되어 균질한 시료를 채취할 수 있어야 한다. 대사(metabolism)를 시험하는 경우 회수액은 시험을 진행하는 동안 피부 세포 생존율을 유지할 수 있어야 한다.

피부제작물(skin preparations)

11. 인체 또는 동물 유래 피부를 사용할 수 있다. 인체 피부의 사용은 국내외의 윤리적 고려사항의 대상이라는 점을 알아야 한다. 생리활성이 있는 피부가 좋지만 피부의 무결성을 증명할 수 있는 경우 생리활성이 없는 피부도 사용할 수 있다. 피부채취기(dermatome)를 이용하여 준비한 상피막(효소, 열 또는 화학적 분리) 또는 부분층 피부(split thickness skin, 일반적으로 두께 200~400 μm) 중 하나를 사용할 수 있다. 전층피부(full thickness skin)를 사용할 수도 있지만 피부층 속 시험물질 확산을 위해 특별히 필요한 경우가 아니라면 과도한 두께(대략 >1 mm)는 피해야 한다. 종의 선정, 해부 위치 및 제작 기법은 반드시 타당성을 제시해야 한다. 시험조제물 당 최소 4개의 조직반복시료에서 얻은 인정가능한 데이터가 필요하다.

피부제작물의 무결성

12. 피부를 적절히 준비하는 것이 매우 중요하다. 부적절한 취급은 각질층에 손상을 초래할 수 있으므로 피부제작물의 무결성을 반드시 확인해야 한다. 피부 대사를 시험하는 경우 갓 채취된 피부를 가능한 한 빠르게 사용해야 하며, 대사 활동을 돕는 것으로 알려진 조건에서 시험해야 한다. 일반적인 지침에 따르면 갓 채취된 피부는 24시간 이내에 사용해야 하지만, 허용되는 저장 기간은 신진대사 및 저장 온도와 관련된 효소계에 따라 달라질 수 있다(13). 피부제작물을 사용 전 저장하는 경우 장벽 기능이 유지됨을 보여주는 증거를 제시해야 한다.

시험물질

13. 시험물질은 투과 특성을 연구할 물질이다. 방사성동위원소가 표지된 시험물질이 가장 이상적이다.

시험조제물

14. 시험조제물(예: 피부에 적용될 시험물질이 들어있는 원물질, 희석 또는 조제된 물질)은 인체 또는 기타 사용하고자 하는 동물 종(target species)에 대한 노출 경로와 유사해야 한다(그렇지 않으면 현실적인 대안 사용). 사용 중인(in-use) 조제물질의 모든 변형은 타당성을 제시해야 한다.

시험물질 농도 및 제형

15. 일반적으로 인체가 노출될 가능성이 있는 실제적 범위를 포괄하는 하나 이상 농도의 시험물질이 보통의 제형으로 사용된다. 그밖에 다양한 일반적 제형을 시험하는 것이 고려되어야 한다.

피부적용

16. 일반적인 조건에서 인체가 화학물질에 노출되는 경우 보통 한정된 용량을 접하게 된다. 그러므로 인체 노출을 모방하여 시험물질을 적용해야 하며, 보통 고체의 경우 피부의 1-5 mg/cm² 이며 액체의 경우 최대 10 μL/cm²까지 적용한다. 예상되는 사용조건 및 시험 목표 또는 시험조제물의 물리적 특성에 따라 용량에 대한 타당성을 제시해야 한다. 예를 들어, 단위 면적당 큰 용량이 적용되는 피부 표면에 대한 적용은 무한할 수 있다.

온도

17. 시험물질의 수동확산(및 그에 따른 피부흡수)은 온도에 영향을 받는다. 확산챔버(diffusion chamber) 및 피부는 일반 피부 온도인 32 °C ± 1 °C와 유사한 온도가 지속적으로 유지되어야 한다. 피부투과장치 설계는 수용체/피부가 생리학적 기준을 유지하도록 하는 다양한 항온 수조 또는 히팅블록 온도를 필요로 한다. 습도는 30 %~70 %가 적당하다.

노출 기간 및 시료채취

18. 시험조제물에 대한 피부 노출은 시험 전 기간 동안 진행하거나 이보다 짧은 기간 진행할 수 있다(예컨대 구체적인 인체 노출 타입을 모방하는 것이 목적인 경우). 적절한 세척 용액을 사용하여 과도한 시험조제물을 피부에서 세척하고 세척 용액은 분석을 위해 회수한다. 시험조제물의 제거 절차는 예상되는 사용 조건에 따라 달라지며 타당성이 제시되어야 한다.

흡수 프로파일을 충분히 특성화하기 위해서는 보통 24시간의 시료채취 기간이 요구된다. 피부의 무결성은 24시간 이후부터 악화하므로 채취 기간은 보통 24시간을 초과해서는 안 된다. 피부에 빠르게 침투하는 시험물질의 경우는 그렇지 않지만 느리게 침투하는 물질의 경우 더 긴 시간이 필요할 수 있다. 회수액의 시료채취 빈도수는 시험물질의 흡수 프로파일을 뚜렷하게 나타낼 수 있어야 한다.

최종 절차

19. 시험계의 모든 요소를 분석해야 하며 회수율을 확인해야 한다. 여기에는 시험물질 적용칸, 피부 표면 세척액, 피부제작물 및 회수액/칸이 포함된다. 경우에 따라 피부를 시험물질 노출부 및 장치 테두리 쪽 피부로 구분하기도 하며, 각질층, 상피 및 진피 부분 등으로 분획하여 분석할 수 있다.

분석

20. 모든 시험에서 적절한 회수가 이루어져야 한다(방사성표지물질의 경우 평균 100 % ± 10 %를 목표로 해야 하며 이에 벗어나는 경우 타당성을 제시해야 함). 적합한 기법을 사용하여 회수액, 피부제작물, 피부표면 세척액 및 기기 세척액 속 시험물질의 양을 분석해야 한다.

데이터 및 기록

데이터

21. 회수액에 대한 분석, 시험계에서 시험물질의 확산 및 시간에 따른 흡수 프로파일이 제시되어야 한다. 한정된 용량의 노출 조건이 사용되는 경우 피부에서 씻겨나간 양, 피부에 남아있는 양(서로 다른 피부층 속 양을 분석하였으면 이를 포함) 및 회수액에 있는 양(적용된 용량의 비율, 양 또는 백분율)을 계산해야 한다. 일부의 경우 피부흡수는 회수액 데이터만을 사용하여 나타낼 수 있다. 그러나 시험물질이 시험 종료시에 피부 속에 남아있는 경우 이를 총 흡수량에 포함할 수 있다(지침서 66단락 참조). 무제한 용량의 노출 조건이 사용되는 경우 투과 상수(permeability constant, K_p)의 계산을 데이터에 포함할 수 있다. 무제한 용량의 노출 조건에서 흡수율은 관련이 없다.

시험보고서

22. 시험보고서는 사용된 시험계의 타당성을 포함한 프로토콜에 기술된 요건이 포함되어야 하며 다음의 조항으로 구성되어야 한다.

시험물질

- 물리적 성상, 물리화학적 특성(최소한 분자량 및 Log P_{ow}), 순도(방사화학적 순도)
- 식별 정보(예: 배치 번호)
- 회수액에서의 용해도

시험조제물

- 제형 및 사용 근거
- 균질성

시험 조건

- 피부 채취 동물의 종 및 부위, 피부 채취 방법, 사용 전 저장 조건, 전처리 방법(세척, 항생제 적용 등), 피부의 무결성 측정값, 대사성, 사용 근거 등
- 투과장치 설계, 회수액 조성, 회수액 유량 또는 시료채취 시간 및 절차
- 시험조제물 적용의 세부 사항 및 적용된 용량의 정량화
- 노출 기간
- 피부에서 시험조제물을 제거하는 방법과 관련한 세부 사항(예: 피부 세척)
- 피부 분석의 세부 사항 및 피부 각 층에서의 흡수도를 평가하기 위한 피부 분절법
- 장치 및 장비 세척 절차
- 분석법, 추출 기법, 분석의 한계 및 분석법 검증

결과

- 시험의 전반적 회수율(적용된 용량 ≡ 피부 세척액 + 피부 + 회수액 + 장치 세척액)
- 장치의 각 부분에서 회수율 분석
- 피부흡수 프로파일
- 도표화된 흡수도 자료(비율, 양 또는 백분율로 표시)

결과에 대한 고찰

결론

참고문헌

- (1) OECD (2004). Test Guideline 427: Skin absorption: Method. OECD, Paris.
- (2) OECD (2004). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.
- (3) 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.
- (4) Kemppainen BW and Reifenrath WG. (1990). Methods for skin absorption. CRC Press, Boca Raton.
- (5) 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.
- (6) Bronaugh RL and Maibach HI. (1991). *in vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications*. CRC Press, Boca Raton.
- (7) European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (1993). Monograph No. 20, Percutaneous Absorption, ECETOC, Brussels.
- (8) 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.
- (9) Recommended Protocol for *in vitro* Percutaneous Absorption Rate Studies (1996). US Federal Register, Vol. 61, No. 65.
- (10) Howes D, Guy R, Hadgraft J, Heylings JR *et al.* (1996). Methods for assessing percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report ATLA 24, 81 R10.
- (11) Schaefer H and Redelmeier TE. (1996). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basel.

- (12) Roberts MS and Walters KA. (1998). Dermal absorption and toxicity assessment. Marcel Dekker, New York.
- (13) Jewell, C., Heylings, JR., Clowes, HM. And Williams, FM. (2000). Percutaneous absorption and metabolism of dinitrochlorobenzene *in vitro*. Arch Toxicol 74: 356-365.

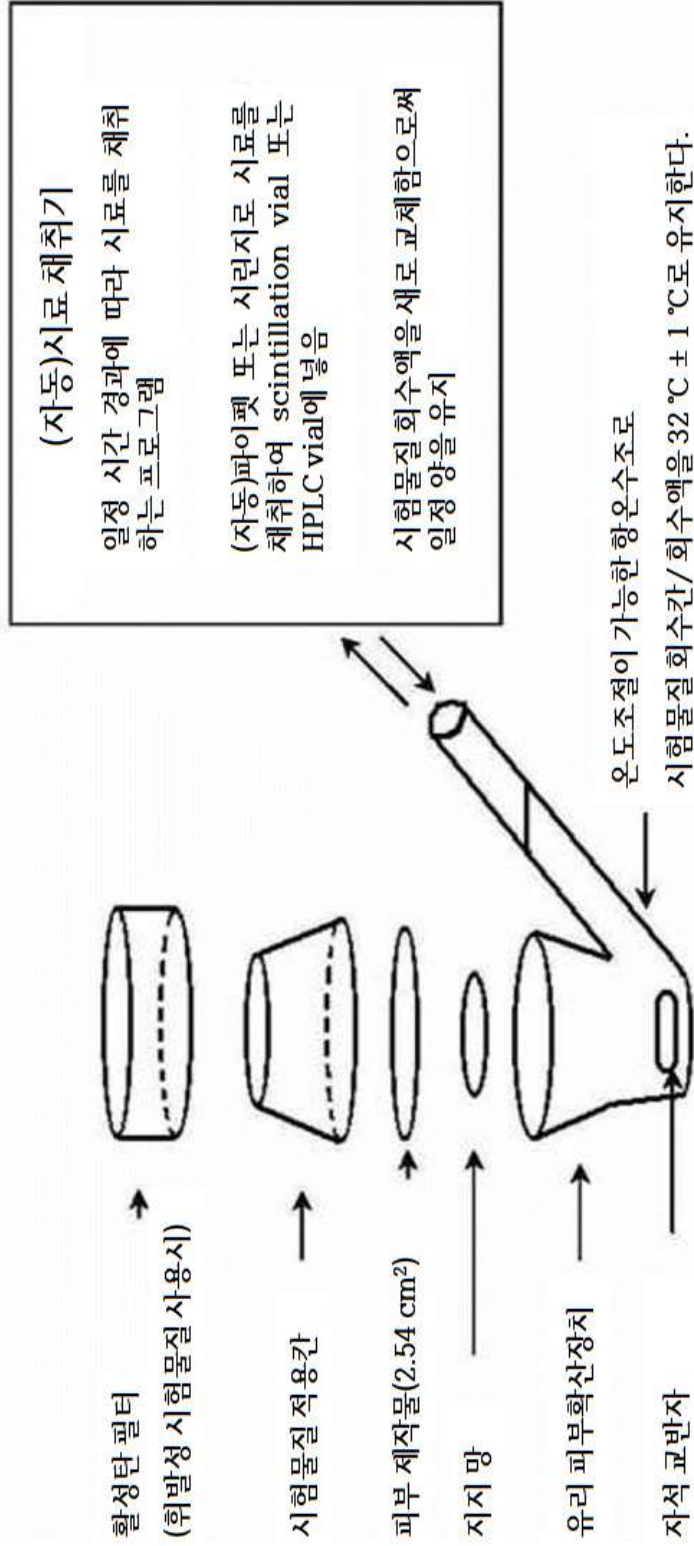


그림1. 생체의 피부흡수시험을 위한 정적 확산장치의 예

Annex

용어 정의

흡수되지 않은 용량(unabsorbed dose): 노출 후 피부 표면에서 세척되거나 노출 동안 피부에서 휘발한 것으로 보이는 모든 용량을 포함한 비차단 커버에 나타난 양

흡수된 용량(absorbed dose)(생체외): 정해진 시간 내에 회수액 또는 전체 순환에 도달한 시험물질의 양

흡수가능한 용량(the absorbable dose)(생체외): 세척 후 피부 위 또는 속에 남아있는 양

III

원문(OECD TG428)

OECD/OCDE

428

Adopted :
13 April 2004

OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS

Skin Absorption: *in vitro* Method

INTRODUCTION

1. This test guideline has been designed to provide information on absorption of a test substance applied to excised skin. It can either be combined with the OECD Test Guideline for Skin Absorption: *In vivo* Method (1), or be conducted separately. It is recommended that the OECD Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies (2) be consulted to assist in the design of studies based on this Test Guideline. The OECD Guidance Document has been prepared to facilitate the selection of appropriate *in vitro* procedures for use in specific circumstances, to ensure the reliability of results obtained by this method.

INITIAL CONSIDERATIONS

2. The methods for measuring skin absorption and dermal delivery can be divided into two categories: *in vivo* and *in vitro*. *In vivo* methods on skin absorption are well established and provide pharmacokinetic information in a range of animal species. An *in vivo* method is separately described in another OECD guideline (1). *In vitro* methods have also been used for many years to measure skin absorption. Although formal validation studies of the *in vitro* methods covered by this Test Guideline have not been performed, OECD experts agreed in 1999 that there was sufficient data evaluated to support the *in vitro* Test Guideline (3). Further details that substantiate this support, including a significant number of direct comparisons of *in vitro* and *in vivo* methods, are provided with the Guidance Document (2). There are a number of monographs that review this topic and provide detailed background on the use of an *in vitro* method (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12). *In vitro* methods measure the diffusion of chemicals into and across skin to a fluid reservoir and can utilise non-viable skin to measure diffusion only, or fresh, metabolically active skin to simultaneously measure diffusion and skin metabolism. Such methods have found particular use as a screen for comparing delivery of chemicals into and through skin from different formulations and can also provide useful models for the assessment of percutaneous absorption in humans.

3. The *in vitro* method may not be applicable for all situations and classes of chemicals. It may be possible to use the *in vitro* test method for an initial qualitative evaluation of skin penetration. In certain cases, it may be necessary to follow this up with *in vivo* data. The Guidance Document (2) should be consulted for further elaboration of situations where the *in vitro* method would be suitable. Additional detailed information to support the decision is provided in an OECD Expert Meeting report (3).

4. This guideline presents general principles for measuring dermal absorption and delivery of a test substance using excised skin. Skin from many mammalian species, including humans, can be used. The permeability properties of skin are maintained after excision from the body because the principal diffusion barrier is the non-viable *stratum corneum*; active transport of chemicals through the skin has not been identified. The skin has been shown to have the capability to metabolise some chemicals during percutaneous absorption (6), but this process is not rate limiting in terms of actual absorbed dose, although it may affect the nature of the material entering the bloodstream.

428**OECD/OCDE****PRINCIPLE OF THE TEST**

5. The test substance, which may be radiolabelled, is applied to the surface of a skin sample separating the two chambers of a diffusion cell. The chemical remains on the skin for a specified time under specified conditions, before removal by an appropriate cleansing procedure. The receptor fluid is sampled at time points throughout the experiment and analysed for the test chemical and/or metabolites.

6. When metabolically active systems are used, metabolites of the test chemical may be analysed by appropriate methods. At the end of the experiment the distribution of the test chemical and its metabolites are quantified, when appropriate.

7. Using appropriate conditions, which are described in this guideline and accompanying guidance document (2), absorption of a test substance during a given time period is measured by analysis of the receptor fluid and the treated skin. The test substance remaining in the skin should be considered as absorbed unless it can be demonstrated that absorption can be determined from receptor fluid values alone. Analysis of the other components (material washed off the skin and remaining within the skin layers) allows for further data evaluation, including total test substance disposition and percentage recovery.

8. To demonstrate the performance and reliability of the test system in the performing laboratory, the results for relevant reference chemicals should be available and in agreement with published literature for the method used. This requirement could be met by testing an appropriate reference substance (preferably of a lipophilicity close to the test substance) concurrently with the test substance or by providing adequate historical data for a number of reference substances of different lipophilicity (e.g. caffeine, benzoic acid, and testosterone).

DESCRIPTION OF THE METHOD**Diffusion cell**

9. A diffusion cell consists of a donor chamber and a receptor chamber between which the skin is positioned (an example of a typical design is provided in Figure 1). The cell should provide a good seal around the skin, enable easy sampling and good mixing of the receptor solution in contact with the underside of the skin, and good temperature control of the cell and its contents. Static and flow-through diffusion cells are both acceptable. Normally, donor chambers are left unoccluded during exposure to a finite dose of a test preparation. However, for infinite applications and certain scenarios for finite doses, the donor chambers may be occluded.

Receptor fluid

10. The use of a physiologically conducive receptor fluid is preferred although others may also be used provided that they are justified. The precise composition of the receptor fluid should be provided. Adequate solubility of the test chemical in the receptor fluid should be demonstrated so that it does not act as a barrier to absorption. In addition, the receptor fluid should not affect skin preparation integrity. In a flow-through system, the rate of flow must not hinder diffusion of a test substance into the receptor fluid. In a static cell system, the fluid should be continuously stirred and sampled regularly. If metabolism is being studied, the receptor fluid must support skin viability throughout the experiment.

Skin preparations

11. Skin from human or animal sources can be used. It is recognised that the use of human skin is subject to national and international ethical considerations and conditions. Although viable skin is preferred, non-viable skin can also be used provided that the integrity of the skin can be demonstrated. Either epidermal membranes (enzymically, heat or chemically separated) or split thickness skin (typically 200-400 µm thick) prepared with a dermatome, are acceptable. Full thickness skin may be used but excessive thickness (*ca.* > 1 mm) should be avoided unless specifically required for determination of the test chemical in layers of the skin. The selection of species, anatomical site and preparative technique must be justified. Acceptable data from a minimum of four replicates per test preparation are required.

Skin preparation integrity

12. It is essential that the skin is properly prepared. Inappropriate handling may result in damage to the *stratum corneum*, hence the integrity of the prepared skin must be checked. When skin metabolism is being investigated, freshly excised skin should be used as soon as possible, and under conditions known to support metabolic activity. As a general guidance, freshly excised skin should be used within 24 hrs, but the acceptable storage period may vary depending on the enzyme system involved in metabolisation and storage temperatures (13). When skin preparations have been stored prior to use, evidence should be presented to show that barrier function is maintained.

Test substance

13. The test substance is the entity whose penetration characteristics are to be studied. Ideally, the test substance should be radiolabelled.

Test preparation

14. The test substance preparation (e.g., neat, diluted or formulated material containing the test substance which is applied to the skin) should be the same (or a realistic surrogate) as that to which humans or other potential target species may be exposed. Any variation from the 'in-use' preparation must be justified.

Test substances concentrations and formulations

15. Normally more than one concentration of the test substance is used in typical formulations, spanning the realistic range of potential human exposures. Likewise, testing a range of typical formulations should be considered.

Application to the skin

16. Under normal conditions of human exposure to chemicals, finite doses are usually encountered. Therefore, an application that mimics human exposure, normally 1-5 mg/cm² of skin for a solid and up to 10 µl/cm² for liquids, should be used. The quantity should be justified by the expected use conditions, the study objectives or physical characteristics of the test preparation. For example, applications to the skin surface may be infinite, where large volumes per unit area are applied.

Temperature

17. The passive diffusion of chemicals (and therefore their skin absorption) is affected by temperature. The diffusion chamber and skin should be maintained at a constant temperature close to

428

OECD/OCDE

normal skin temperature of $32 \pm 1^\circ\text{C}$. Different cell designs will require different water bath or heated block temperatures to ensure that the receptor/skin is at its physiological norm. Humidity should preferably be between 30 and 70%.

Duration of exposure and sampling

18. Skin exposure to the test preparation may be for the entire duration of the experiment or for shorter times (i.e., to mimic a specific type of human exposure). The skin should be washed of excess test preparation with a relevant cleansing agent, and the rinses collected for analysis. The removal procedure of the test preparation will depend on the expected use condition, and should be justified. A period of sampling of 24 hours is normally required to allow for adequate characterisation of the absorption profile. Since skin integrity may start to deteriorate beyond 24 hours, sampling times should not normally exceed 24 hours. For test substances that penetrate the skin rapidly this may not be necessary but, for test substances that penetrate slowly, longer times may be required. Sampling frequency of the receptor fluid should allow the absorption profile of the test substance to be presented graphically.

Terminal procedures

19. All components of the test system should be analysed and recovery is to be determined. This includes the donor chamber, the skin surface rinsing, the skin preparation and the receptor fluid/chamber. In some cases, the skin may be fractionated into the exposed area of skin and area of skin under the cell flange, and into *stratum corneum*, epidermis and dermis fractions, for separate analysis.

Analysis

20. In all studies adequate recovery should be achieved (the aim should be a mean of $100 \pm 10\%$ of the radioactivity and any deviation should be justified). The amount of test substance in the receptor fluid, skin preparation, skin surface washings and apparatus rinse should be analysed, using a suitable technique.

DATA AND REPORTING

Data

21. The analysis of receptor fluid, the distribution of the test substance chemical in the test system and the absorption profile with time, should be presented. When finite dose conditions of exposure are used, the quantity washed from the skin, the quantity associated with the skin (and in the different skin layers if analysed) and the amount present in the receptor fluid (rate, and amount or percentage of applied dose) should be calculated. Skin absorption may sometimes be expressed using receptor fluid data alone. However, when the test substance remains in the skin at the end of the study, it may need to be included in the total amount absorbed (see Guidance Document, paragraph 66). When infinite dose conditions of exposure are used the data may permit the calculation of a permeability constant (K_p). Under the latter conditions, the percentage absorbed is not relevant.

Test report

22. The test report must include the requirements stipulated in the protocol, including a justification for the test system used and should, comprise the following:

Test substance:

- physical nature, physicochemical properties (at least molecular weight and log P_{ow}), purity (radiochemical purity);
- identification information (e.g. batch number);
- solubility in receptor fluid.

Test preparation:

- formulation and justification of use;
- homogeneity.

Test conditions:

- sources and site of skin, method of preparation, storage conditions prior to use, any pre-treatment (cleaning, antibiotic treatments, etc.), skin integrity measurements, metabolic status, justification of use;
- cell design, receptor fluid composition, receptor fluid flow rate or sampling times and procedures;
- details of application of test preparation and quantification of dose applied;
- duration of exposure;
- details of removal of test preparation from the skin, for example, skin rinsing;
- details of analysis of skin and any fractionation techniques employed to demonstrate skin distribution;
- cell and equipment washing procedures;
- assay methods, extraction techniques, limits of detection and analytical method validation.

Results:

- overall recoveries of the experiment (Applied dose \equiv Skin washings + Skin + Receptor fluid + Cell washings);
- tabulation of individual cell recoveries in each compartment;
- absorption profile;
- tabulated absorption data (expressed as rate, amount or percentage).

Discussion of results.

Conclusions.

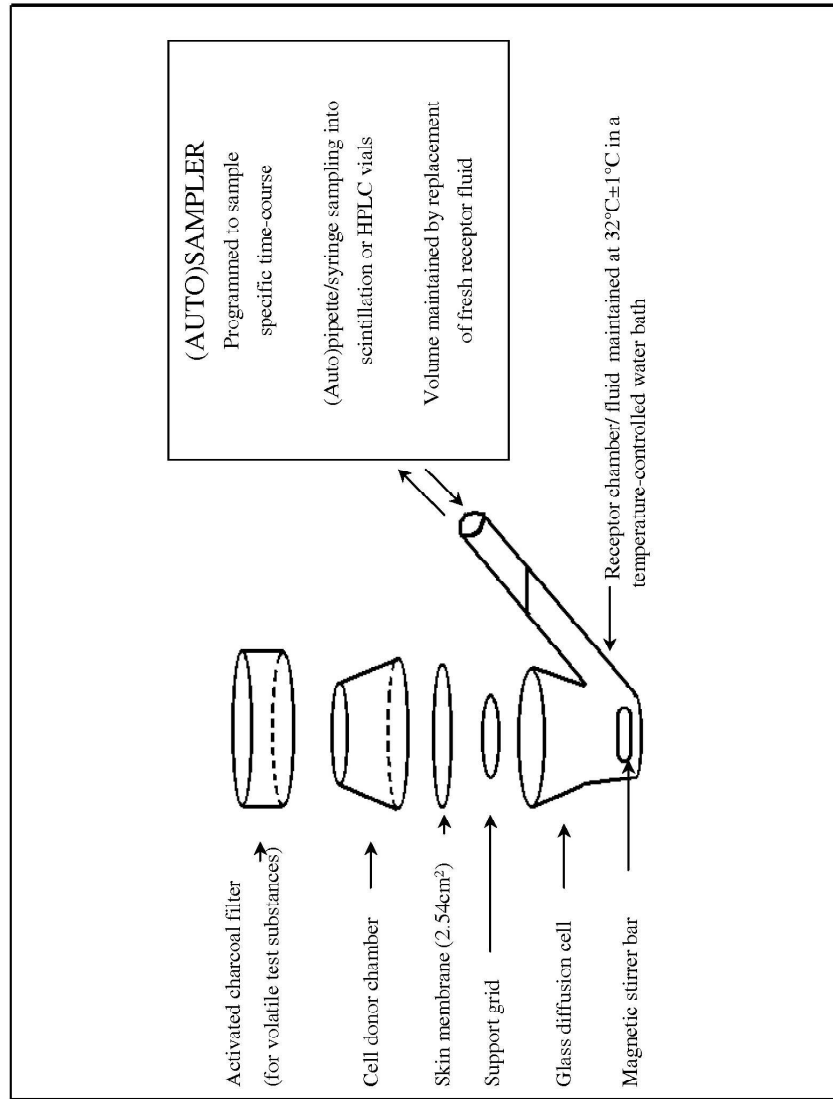
428

OECD/OCDE

LITERATURE

- (1) OECD (2004). Test Guideline 427: Skin absorption: *in vivo* Method. OECD, Paris.
- (2) OECD (2004). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.
- (3) 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.
- (4) Kempainen BW and Reifenrath WG. (1990). Methods for skin absorption. CRC Press, Boca Raton.
- (5) 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.
- (6) Bronaugh RL and Maibach HI. (1991). *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications*. CRC Press, Boca Raton.
- (7) European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (1993). Monograph No. 20, Percutaneous Absorption, ECETOC, Brussels.
- (8) 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.
- (9) Recommended Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Rate Studies (1996). US Federal Register, Vol. 61, No. 65.
- (10) Howes D, Guy R, Hadgraft J, Heylings JR *et al.* (1996). Methods for assessing percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report ATLA 24, 81 R10.
- (11) Schaefer H and Redelmeier TE. (1996). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basel.
- (12) Roberts MS and Walters KA. (1998). Dermal absorption and toxicity assessment. Marcel Dekker, New York.
- (13) Jewell, C., Heylings, JR., Clowes, HM. And Williams, FM. (2000). Percutaneous absorption and metabolism of dinitrochlorobenzene *in vitro*. *Arch Toxicol* 74: 356-365.

Figure 1: An example of a Typical Design of a Static Diffusion Cell for *in vitro* Percutaneous Absorption Studies



428

OECD/OCDE

ANNEX

DEFINITIONS

Unabsorbed dose: represents that washed from the skin surface after exposure and any present on the non-occlusive cover, including any dose shown to volatilise from the skin during exposure.

Absorbed dose: (*in vitro*); mass of test substance reaching the receptor fluid or systemic circulation within a specified period of time.

The absorbable dose: (*in vitro*) represents that present on or in the skin following washing.

**“화장품 등 피부흡수 동물대체시험법
(생체의 피부흡수시험법, Skin Absorption: *in vitro* Method)
가이드라인(민원인 안내서)”**

발행일 2023년 5월
발행인 식품의약품안전평가원장
편집위원장 독성평가연구부장 오재호
편집위원 이윤숙, 윤소영, 김주환, 강남희, 이정선, 방서영, 길가애, 차민희
도움주신분 정미숙, 손동원(바이오독스텍), 박창언(한국화학융합시험연구원)
문의처 식품의약품안전평가원 특수독성과
Tel : 043-719-5153, 5155 Fax : 043-719-5150
주소 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명 2로 187,
오송보건의료행정타운 식품의약품안전처 식품의약품안전평가원

공익신고자 보호제도란?

- 공익신고자(친족 또는 동거인 포함)등이 공익신고 등으로 인하여 피해를 받지 않도록 **비밀보장, 불이익보호조치, 신분보호조치** 등을 통하여 보호하는 제도

[공직자 부조리 및 공직신고안내]

- ▶ 부조리 신고 : 식약처 홈페이지 “국민신문고 >공직자 부조리 신고” 코너
- ▶ 공익 신고 : 식약처 홈페이지 “국민소통 >신고 센터 >부패·공익신고 상담” 코너

♣ 보호조치 요구 방법

우편(30102) 세종특별자치시 도움5로 20 정부세종청사 7동, 국민권익위원회 공익보호지원과.
전화 044-200-7773