



## 동물대체시험법 소개 : 피부 자극시험 대체법을 중심으로



산업안전보건연구원 흡입독성연구센터  
병리검사부 연구위원

조은상

전 세계적으로 현재의 독성시험은 기존의 동물 이용을 전체적으로, 또는 일부 대체하는 시험으로 개발, 진행되는 추세이다. 실험에 사용되는 동물의 고통과 스트레스를 완화하고, 사용되는 개체 수를 줄이며, 동물실험을 대체할 수 있는 3R 원칙(Replacement, Refinement, Reduction)이 적용된 동물대체시험법(Alternative Test Methods)은 실제로 미주 및 유럽을 중심으로 시작되었다. 2007년, 미국의 국립연구위원회(National Research Council) 및 유럽 연합과 연계한 여러 연구소를 중심으로 Toxicity testing in

the 21st century 또는 SEURAT-1(Safety evaluation ultimately replacing animal testing) 프로젝트를 통해 다양한 대체시험 연구가 진행되어 왔고, 10여 년의 연구 끝에 생식독성 및 발달독성 분야의 새로운 프로젝트인 ToxRisk가 그 연장선상에서 추진되고 있다.

국내에서도 3R을 이유로 동물을 이용한(in vivo) 실험보다 시험관적 방법(In vitro) 또는 컴퓨터 분석적 방법(in silico)이 다양하게 연구 및 개발되고 있지만 화학물질의 독성 탐색의 측면에서 이용하기에는 어려움이 많다. 2015년 '화학물질의 등록 및 평가 등에 관한 법률', 일명 '화평법'이 도입되면서 많은 동물 시험 기관에서 추가적인 동물 시험을 의뢰받아 진행 중에 있다. 이용될 실험동물의 수는 정확히 집계되지는 않았지만, 과거 농림축산검역본부의 동물실험 실태 조사에 따르면 2014년 241만, 2015년 250만, 2016년 287만 마리 이상의 실험동물이 국내 동물실험에 사용된 것으로 집계되고 있다. '화평법'에 따라 다수의 화학물질에 대해 추가적인 동물실험을 수행해야 할 필요성은 있지만, 이는 세계적 추세에는 맞지 않다. 또한 기본적인 독성 데이터의 축적은 아직까지도 동물 실험에서 획득된 자료들을 기반으로 이뤄지고 있긴 하지만 4차 산업혁명과 더불어 새로운 조합의 시도를 계속 진행해 컴퓨터, 바이오칩, 인간의 생체조직 대체물질 등의 방법으로 기존의 독성 시험을 대체하려는 연구들이 필요하다. 이러한 노력의 일환으로 국내에서 현재 개발된 동물대체시험법들에 대한 소개 및 앞으로의 전망에 대해 알아보려 한다.

## 주요 동물대체시험법

국내에서 동물대체시험을 알리기 위해 각 연구 분야 및 정부 부처에서 다양한 활동을 하고 있다. 특히 식품의약품안전처는 국외 다수의 나라에서 그랬듯이 2015년 화장품의 안전성에 대해 대체시험방법이 있는 경우 동물실험을 할 수 없도록 이미 법 개정을 완료하였고, 한국동물대체시험법검증센터(KoCVAM)와 연관해 국제적으로 인정되는 동물대체시험법의 가이드라인을 개발하는데 앞장 서고 있다. 다양한 대체시험법 중 사실상 가장 먼저 개발된 분야는 화장품 완제품 및 화장품 원료에 대한 동물시험이다. 화장품 원료는 대부분 합성화학물질이나 낮은 용량의 천연물이 포함되기도 하는데, 유럽연합은 2003년부터 화장품 완제품

품에 대한 동물실험을 금지시켰고, 2013년에는 모든 화장품 원료에 대해 동물실험을 금지시켰다. 이스라엘 및 인도에서도 화장품에 대한 동물실험을 법적으로 금지한 바 있으며, 미국 및 호주 등의 나라들도 현재 법안을 준비 중이다.

식품의약품안전평가원은 ‘화장품 독성시험 동물대체시험법’ 가이드라인으로 대표되는, 사용되는 동물의 숫자나 고통을 줄이거나 또는 완전히 비 동물로 대체하는 다양한 시험법들을 지속적으로 제·개정하여 발표하고 있다. 현재 발표된 13개의 대체 시험법 중 완전한 동물대체 시험법을 다음의 표와 같다<표 1>.

**<표 1> 국내 알려진 완전대체가 가능한 동물대체시험법**

시험 분야	국문 시험명 (OECD guide)	제(개)정 연도	의의
광독성 시험법	In vitro 3T3 NRU 광독성시험법 (TG 432)	2007	기니피그를 이용하지 않고, 특정 세포주에서 시험물질에 의한 세포 생존률을 측정
피부흡수 시험법	생체외 피부흡수시험 (TG 428)	2009	동물에서 물질의 흡수 정도를 측정하는 대신 인체피부모델 등으로 대체
안자극 시험법	소각막을 이용한 안점막자극시험법(BCOP 시험법) (TG 437)	2014	살아있는 토끼의 각막 대신 도축된 소의 각막을 이용
피부자극 시험법	인체피부모델을 이용한 피부자극시험법 (TG 439)	2014	토끼를 이용한 피부자극 평가를 3차원으로 배양된 인체피부모델로 대체
안자극 시험법	닭의 안구를 이용한 안점막자극시험법 (ICE 시험법) (TG 438)	2015	살아있는 토끼의 각막 대신 도축된 닭의 각막으로 대체
피부감작성 시험법	In Chemico 펩타이드 반응을 이용한 피부감작성 시험법 (TG 442C)	2016	동물을 이용하지 않고 펩타이드 반응성 분석으로 평가
안자극 시험법	인체각막 유사 상피모델을 이용한 안자극시험법 (TG 492)	2016	살아있는 토끼의 각막 대신 인체각막 유사모델로 대체

## 피부 자극시험 대체법

위의 대체법 중 기존의 피부자극시험법을 대신해 사용되고 있는 ‘인체피부모델을 이용한 피부자극시험법’은 과거 알비노 토끼의 피부에 시험물질을 도포해 1~3일 내 홍반, 가피형성 및 부종의 유무를 관찰해 점수를 매기는 방식(TG

404)에서 벗어나 EpiSkin™(SkinEthic), EpiDerm™(MatTek), SkinEthic™ RHE(SkinEthic) 및 LabCyte EPI-MODEL24 SIT(JTEC)의 모델명을 지닌 3차원으로 구성된 인체피부모델을 이용한다<표 2>.

<표 2> 주요 인체피부모델 비교

모델명	제조국 (제조사)	기원 세포	면적
EpiSkin™	프랑스 (Loreal SkinEthic)	성인 피부	0.38 cm <sup>2</sup> /개
EpiDerm™ SIT	미국 (MatTek)	신생아 포피	0.64 cm <sup>2</sup> /개
SkinEthic RHE™	프랑스 (Loreal SkinEthic)	신생아 포피	0.5 cm <sup>2</sup> /개
LabCyte EPI-MODEL24 SIT	일본 (J-TEC)	신생아 포피	0.03 cm <sup>2</sup> /개

이 모델들은 피부의 표피를 이루는 주요 세포인 각질세포를 각질층, 과립층, 유극층, 및 기저층으로 분화시켜 실제 사람 피부와 흡사한 생화학적, 생리학적인 특성을 갖춘 재구성된 각질세포층(3D)을 13~18일 동안 배양해 인공적으로 생산한 것으로, 많은 피부모델들이 개발되고 있지만, 현재 국제적으로 이용되는 피부 모델(OECD 채택)은 위에 기재된 네 가지뿐이다. 이 중 EpiSkin™은 최초의 피부 모델로서 유럽대체시험법검증센터에서 이용되었고, 차후로 OECD 유사시험법 평가기준의 근거로 이용된 바 있다.

‘인체피부모델을 피부자극시험법’은 GHS 범주3에 해당하는 약한 자극성 물질에 대한 평가는 불가능하나, 범주2에 해당하는 자극성 물질을 평가할 수 있으며, 자극성 물질에 의한 세포 및 조직 손상의 초기 단계를 세포 생존율을 통해 판독하고, 정해진 역치 수준(≤50%) 이하로 세포 생존율이 감소되면 피부자극성을 확인하는 시험법이다. 이러한 과정의 해석은 음성대조물질(생존율 100%로 가정)의 결과를 표준화된 생존율로서 재계산하여 이뤄진다.

보편적인 시험 절차로서 피부모델의 전배양→시험물질 적용→시험물질 세척→피부모델의 후배양→세포 생존율 탐색 색소 측정→생존율 분석의 과정을 거치게 된다. 각각의 시험물질과 대조물질(양성 및 음성 대조물질)을 각기 3반복으로 실시해야 하며, 결과의 판독에는 항상 생존율(음성대조군 기준)과 피부조직의

민감도(양성대조군 기준)가 정해진 실험결과범위(reference) 안에 포함되어야 한다. 또한 생존율 분석을 위한 탐색 색소의 측정 단계에서는 시험물질의 성질 또는 시약과의 반응으로 인해 색소 발생 과정 중 오차가 생길 수 있으므로 각 피부 모델 별 표준작업지침서(SOP)에 기술된 내용을 주의 깊게 살펴봐야 한다.

## 소개를 마치며

앞으로 동물대체시험법은 데이터가 축적됨에 따라 기존의 동물을 이용한 독성 시험을 완벽히는 아니라도 충분히 대신할 수 있는 시험이 될 수 있다. 산업이 발달할수록 새로운 화학물질은 지속해서 개발되지만, 모든 화학물질에 대해 독성을 평가하기 위한 동물실험을 수행하는 것은 수많은 생명에 대한 희생, 비용의 낭비, 무엇보다 안전성과 유효성에 대한 확신을 충족시킬 수 없다는 점에서 개선의 여지가 충분하다. 산업보건 분야의 유해·위험성 평가도 시대의 흐름에 맞춰 동물 대체법을 개발하는 것에 좀 더 치중해야 할 것으로 여겨진다. 🙌

## 참고 문헌

1. 식약처. (2014) 「화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인(V) : 인체피부모델을 이용한 피부자극시험」. ECVAM. (2009) Performance Standards in vitro skin irritation test methods based on Reconstructed human Epidermis (RHE). ECVAM.
2. EpiSkin™. (2009) SOP, Version 1.8 ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ Test Method 15min–42hours for the Prediction of acute Skin Irritation of Chemicals.
3. EpiDerm™. (2009) SOP, Version 7.0, Protocol for: In Vitro EpiDerm™ Skin Irritation Test(EPI-200–SIT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm(EPI-200).
4. LabCyte. (2011) EPI-MODEL24 SIT SOP, Version 8.3, Skin Irritation Test Using the Reconstructed Human Model "LabCyte EPI-MODEL24".
5. OECD. (2015) In vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 439. OECD Paris.
6. SkinEthic™ RHE. (2009) SOP, Version 2.0. SkinEthic Skin Irritation Test–42bis Test Method for the Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals: 42Minutes Application 42Hours Post-Incubation.