

KOSHA GUIDE

W - 9 - 2021

화학물질의 피부과민성시험 기술지침

2021. 10.

한국산업안전보건공단

안전보건기술지침의 개요

- 작성자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 조해원
- 개정자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 김용순
- 개정자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 조은상
- 개정자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 조중래

- 제 · 개정 경과
 - 2011년 11월 산업위생분야 제정위원회 심의(제정)
 - 2015년 5월 산업독성분야 제정위원회 심의(개정, 법규개정조항 반영)
 - 2016년 10월 산업독성분야 제정위원회 심의(개정, 법규개정조항 반영)
 - 2021년 09월 산업독성분야 기준제정위원회 심의(개정)

- 관련규격 및 자료
 - OECD guideline 406 for testing of chemicals (Skin sensitisation)

- 관련법규·규칙·고시 등
 - 산업안전보건법 제105조(유해인자의 유해성·위험성 평가 및 관리), 제108조(신규화학물질의 유해성·위험성 조사)
 - 산업안전보건법 시행규칙 제141조(유해인자의 분류기준), 제143조(유해인자의 관리 등)
 - 고용노동부 예규 제166호(화학물질의 유해성·위험성 평가에 관한 규정)
 - 국립환경과학원 고시 제2020-46호(화학물질의 시험방법에 관한 규정)
 - 고용노동부 고시 제2020-30호(화학물질의 분류·표시 및 물질안전보건자료에 관한 기준)

- 기술지침의 적용 및 문의
 - 이 기술지침에 대한 의견 또는 문의는 한국산업안전보건공단 홈페이지(www.kosha.or.kr)의 안전보건기술지침 소관분야별 문의처 안내를 참고하시기 바랍니다.
 - 동 지침 내에서 인용된 관련규격 및 자료, 법규 등에 관하여 최근 개정본이 있을 경우에는 해당 개정본의 내용을 참고하시기 바랍니다.

공표일자 : 2021년 10월

제 정 자 : 한국산업안전보건공단 이사장

화학물질의 피부과민성시험 기술지침

1. 목적

이 지침은 국립환경과학원 고시 제2020-46호(화학물질의 시험방법에 관한 규정) 별표 제5항 피부과민성시험 항목에 대한 시험방법이다. 이 지침은 산업안전보건법 시행규칙 제141조(유해인자의 분류기준) 별표 18 유해인자의 유해성·위험성 분류기준 명칭과 통일하고, 근로자의 화학물질 취급에 따른 피부과민성 평가를 위한 실험동물 시험법을 제시하여 노출에 의한 화학물질의 건강 유해성 등급을 정하고자 하는데 목적이 있다.

2. 적용범위

이 시험지침은 국립환경과학원 고시 제2020-46호(화학물질의 시험방법에 관한 규정) 별표 제5장(건강영향 시험분야) 제5항(피부과민성시험) 항목에 대한 시험법으로 적용한다.

3. 용어의 정의

(1) 이 지침에서 사용하는 용어의 정의는 다음 각 호에 의한다.

(가) "피부과민성"이라 함은 피부에 접촉되어 피부 알레르기 반응을 일으키는 것을 말한다.

(나) "GHS(Globally Harmonized Classification System for Chemical Substances and Mixtures)"이라 함은 국제적으로 조화된 화학물질의 분류 시스템을 말한다.

(다) "시험물질"이라 함은 시험의 대상이 된 물질을 말한다.

(라) "대조물질"이라 함은 시험물질과 비교할 목적으로 시험에 사용되는 물질을 말한다.

- (마) "피내주사"라 함은 표피 바로 밑에 있는 진피층에 매우 적은 양의 약물을 투여하는 것을 말한다.
- (바) "폐쇄접포"라 함은 수 시간 이상 시험물질을 동물의 피부에 부착시킬 목적으로 거즈나 패치 등을 사용하여 시험 물질 처리부위가 이탈되거나 오염되는 것을 방지하는 것을 말한다.
- (사) "유도노출(Induction exposure)"이라 함은 과민상태를 유발하기 위해 시험물질을 시험개체에 실험적으로 노출시키는 것을 말한다.
- (아) "유도기간(Induction period)"이라 함은 과민상태를 유발하는 유도노출 후 최소한 1주일 간의 기간을 말한다.
- (자) "감작(Sensitization)"이라 함은 시험동물에 1차 노출시켜 면역반응을 유도한 시험물질을 재차 노출시킴으로서 처음보다 훨씬 강한 면역반응을 일으키는 것을 말한다.
- (차) "유발노출(Challenge exposure)"이라 함은 시험대상이 과민증을 보이는지의 여부를 판단하기 위해 유도기간 후 이전에 처리한 시험대상을 시험물질에 실험적으로 노출시키는 것을 말한다.
- (카) "감작률"이란 전체 동물수에 대한 양성 동물수(시험물질을 처리한 동물의 피부반응평가 결과가 일반적으로 1등급 내지 그 이상 등급의 시험동물수)의 백분율을 말한다.
- (타) "부형제"라 함은 시험물질 또는 대조물질이 시험계에 용이하게 적용되도록 시험물질 또는 대조물질을 혼합, 분산, 용해시키는 데 이용되는 물질을 말한다.
- (파) "투여"란 용량, 투여횟수, 도포면적 및 노출기간을 포함하는 포괄적인 의미를 가진다.
- (하) "홍반"이라 함은 모세혈관의 울혈에 의한 피부 발적 등 여러 가지 원인으로 인하여 혈액에 의해 피부에 나타나는 적색반응을 말한다.

- (거) “부종”이라 함은 체액이 피하조직에 축적되어 부어오르는 것을 말한다.
- (너) “시험책임자”라 함은 해당시험에 대한 전문지식과 경험이 있는 전문가로서 해당시험의 계획, 시행, 보고서 작성 등 시험전반을 책임지는 자를 말한다.
- (더) “동물관리책임자”라 함은 동물시험에 대한 전문지식과 경험이 있는 전문가로서 동물실 운영 등 동물관리 전반을 책임지는 자를 말한다.
- (러) “GLP(Good Laboratory Practice)”라 함은 우수실험실기준으로 시험기관에서 행해지는 시험의 계획, 실행, 점검, 기록, 보고되는 과정 및 그 조건들과 관련된 총체적 사항을 규정하는 것을 말한다.
- (2) 기타 이 지침에서 사용하는 용어의 정의는 특별한 규정이 있는 경우를 제외하고는 국립환경과학원 고시 제2020-46호(화학물질의 시험방법에 관한 규정)에서 정하는 바에 의한다.

4. 시험계획서 작성

4.1 목적

피부과민성시험을 실시하기 위하여 시험계획서를 작성한다.

4.2 시험계획서 작성 시기

- (1) 시험책임자는 운영책임자로부터 시험책임자로 지정되면 시험물질의 조제 등에 관한 자료를 확보하고 시험계획서를 작성한다.
- (2) 시험책임자는 시험계획서가 운영책임자에 의하여 승인되면, 실험동물윤리위원회심의 및 동물구입 신청이 원활히 이루어 질 수 있도록 한다.

4.3 시험계획서 작성방법

시험계획서에는 표지 및 시험개요, 시험세부계획이 포함되도록 한다.

(1) 표지 및 시험개요

표지 및 시험개요에는 시험번호, 시험명, 작성일, 시험일정, 의뢰기관, 시험기관명, 각 시험부문별 확인 및 승인사항이 나타나도록 한다.

(2) 시험세부계획

시험세부계획은 <표 1>에 따른다.

<표 1> 시험세부계획

순서	내용	순서	내용
1	시험목적	8	투여방법
2	적용된 시험방법	9	시험항목
3	사용된 시험계	10	통계처리
4	동물사육 환경	11	보관될 기록 및 자료
5	사료	12	GLP대응 및 신뢰성 보증
6	음용수	13	참고문헌
7	시험물질 및 대조물질	14	첨부자료

5. 독성시험 수행

시험책임자는 작성된 시험계획서에 따라 다음과 같이 독성시험을 수행한다.

5.1 시험의 준비

5.1.1 동물입수 준비

(1) 시험책임자는 동물관리책임자와 협의하여 사용할 동물실을 결정한다.

- (2) 동물관리책임자는 사용할 동물실의 환경, 청소 소독, 설비를 점검하고 이상이 없도록 준비한다.
- (3) 시험책임자는 시험에 사용될 장비가 완전히 갖추어 진 것을 확인한다.
- (4) 동물관리책임자는 개체식별카드를 미리 작성하여 사육상자 전면에 부착한다.
- (5) 동물관리책임자는 동물실 사용기록지를 작성하여 사용할 동물실의 전면에 부착한다.

5.1.2 시험동물

- (1) 건강하고 젊은 성숙한 기니픽(Guinea-pig) 300~400 g을 사용한다.
- (2) 정당한 이유가 있을 경우에는 다른 동물을 이용해도 상관없다.
- (3) 암컷을 사용할 때에는 출산 경험이 없고 임신하지 않은 것이어야 한다.
- (4) 시험에 사용할 개체는 시험 시작 전 최소 5일 이상 실험실에서 순화시킨 건강한 동물 중에서 무작위로 선정한다.
- (5) 최소한 20마리의 시험군과 10마리의 대조군을 이용하여 실험한다. 재시험 시 최소한 10마리의 시험군과 5마리의 대조군을 이용하여 실험한다.

5.1.3 사육조건

- (1) 사육실은 온도가 $22\pm 3^{\circ}\text{C}$, 습도가 $50\pm 20\%$, 환기횟수 13~15 회/hr, 조도 200~300 Lux가 유지되도록 한다.
- (2) 조명은 명암이 12시간 점등, 12시간 소등(08:00~20:00)이 되도록 조절한다.
- (3) 먹이는 기니픽(Guinea-pig) 전용 사료를 사용하고, 음수는 자외선 살균처리된 음용수를 자유 급식한다.

5.2 시험의 방법

5.2.1 기니픽(Guinea-pig) Maximization Test(GPMT)

면역보조제인 Freund's Complete Adjuvant(FCA)를 병용 투여하여 알레르기 상태를 일으키기 쉽게 하는 방법이다.

5.2.1.1 시험물질의 감작항원량 및 야기항원량 (예비시험)

(1) 피내주사에 의한 감작시 감작항원량

(가) 시험물질을 증류수 또는 적절한 용매로 용해한 후 단계별로 희석하여 제모 된 기니픽(Guinea-pig)의 등에 피내 주사한다. 반드시 시험물질의 각 농도별로 2마리 이상의 기니픽(Guinea-pig)을 사용한다.

(나) 피내주사 24시간 후에 주사부위를 관찰하여 2마리 이상 기니픽(Guinea-pig) 모두에서 피부괴사가 나타나지 않은 최고농도를 감작항원량으로 정한다.

(2) 폐쇄접포에 의한 감작 및 야기시의 항원량

(가) 시험물질을 증류수 또는 적절한 용매로 용해한다.

(나) 단계별로 희석하여 제모(4×6 cm)된 기니픽(Guinea-pig)의 측복부에 시험물질 단계별 희석액 0.5 ml을 포함하는 패취(2×4 cm)를 부착하여 24시간 폐쇄접포한다.

(다) 반드시 시험물질의 각 농도별로 2마리 이상의 기니픽(Guinea-pig)을 사용한다.

(라) 2마리 이상에서 모두 홍반이 나타나는 최저농도를 감작항원량으로 하며, 야기항원량은 홍반이 나타나지 않는 최대농도를 사용한다.

5.2.1.2 본시험

(1) 1차 감각

어깨부위의 털을 제거하고 <그림 1>과 같은 방법으로 동물 등부위 피부의 중앙선 양쪽의 3쌍에 좌우대칭으로 각 1개소에 0.1 ml 씩 여러 부위에 나누어 피내주사를 실시한다.

<그림 1> 기니픽(Guinea-pig) 투여부위

머리쪽			
①	■	①	■
②	■	②	■
③	■	③	■
꼬리쪽			

※ 부위①과 ②는 서로 가깝게 위치하게 하고 머리쪽에 가까운 반면, 부위③은 꼬리 쪽으로 위치하게 한다(■, Injection sites).

(가) 처리군(0일)

부위 ① : FCA와 멸균증류수(혹은 생리식염수)를 1:1로 혼합한 물질

부위 ② : 적당한 용매에 용해된 결정된 농도의 시험물질

부위 ③ : 결정된 농도의 시험물질과 FCA를 1:1로 혼합한 물질

(나) 대조군(0일)

부위 ① : FCA와 멸균증류수(혹은 생리식염수)를 1:1로 혼합한 물질

부위 ② : 시험물질의 용매 단독

부위 ③ : FCA와 용매를 1:1로 혼합한 물질

(2) 2차 감각(유도노출)

(가) 처리군 및 대조군(6일)

1차 감각 6일 후 필요하다면 시험물질에 의한 감각의 증강을 위해 시험물질 도포 24시간 전에 국부적인 자극성(경도의 염증)을 유발하기 위하여 바세린을 이용하여 만든 10% SLS(Sodium Lauryl Sulfate)를 마리당 0.5 g 씩 도포한다.

(나) 처리군(7일)

1차 감각 1주 후 시험물질을 피내주사 했던 동일부위를 제모(4×6 cm)한다. 시험물질 0.5 ml을 포함하는 패취(2×4 cm)를 알루미늄 호일과 탄력밴드(elastic band)를 이용하여 48시간 동안 폐쇄접포 한다. 고상일 경우에는 미세한 분말상태로 하여서 적절한 용매에 혼합하여 처리한다.

(다) 대조군(7일)

처리군과 동일하나 처리물질이 시험물질의 용매이다.

(3) 감각야기(유발노출)

(가) 처리군과 대조군(21일)

폐쇄접포에 의한 2차 감각 2주 후 시험동물의 등부위 혹은 측복부(감작부위와는 다른 부위여야 함)를 제모(4×6 cm)하고 시험물질을 포함하는 패취(2×4 cm)를 부착하여 24시간동안 폐쇄접포하여 야기 시킨다.

(4) 관찰 및 판정

(가) 패취 제거 후 24시간(필요에 따라 패취 제거 후 21시간에 제모하고 제모 후 3시간), 48시간(감작야기 시작으로부터 72시간)에 측복부를 관찰한다.

(나) 일반증상 관찰

모든 피부반응, 감각유도 및 감각야기 단계를 거치는 동안 발생한 비정상적인반응을 관찰한다. 필요에 따라 병리조직학적 검사 및 피부의 두께 등을 측정할 수도 있다.

(다) 체중측정

군분리시, 시험물질 투여 전, 시험개시 후 주 1회 및 시험종료일에 개체

별 체중을 측정한다.

(라) 피부의 관찰 및 평가방법

피부반응 평가기준 <별표 1>에 의해 피부소견의 평가를 실시하고 피부과민성 평가기준 <별표 2>에 따라 피부과민성의 정도를 평가한다. 대조동물의 감작 시험결과가 모두 1등급 이하이면서 시험물질을 처리한 동물의 과민성 시험결과가 일반적으로 1등급 내지 그 이상 등급의 시험동물은 감작반응을 나타내는 것으로 본다. 대조동물이 1등급 이상으로 나타나면 대조동물의 가장 심한 반응보다 더한 시험동물의 반응은 감작반응으로 인한 것으로 본다.

5.2.2 Buehler test method

면역보조제를 사용하지 않는 시험법으로 면역보조제를 이용하는 시험법에서 얻어지는 양성소견을 재확인하기 위해서 이용되는 시험법이다.

5.2.2.1 시험물질의 감작항원량 및 야기항원량(예비시험)

시험물질의 폐쇄접포에 의한 감작시의 감작항원량 및 야기시의 항원량을 결정하고자 한다. 감작유도를 위한 시험물질의 농도는 경미한 자극을 일으킬 수 있는 농도 중 가장 높은 농도를 선택하고, 감작야기 농도는 자극성을 일으키지 않는 농도 중 최고농도로 한다. 농도 결정 방법은 GPMT와 동일하다.

5.2.2.2 본시험

(1) 감작유도(국소유도단계)

(가) 처리군(0, 7, 14일)

폐쇄접포를 하기 위해서 제모된 등부위(4×6 cm)에 시험물질 0.5 ml를 포화시킨 패치(Whatman # 3 filter paper, 2×4 cm)를 부착하고, 시험물질이 흘러나오지 않게 거즈 3 겹을 덮고 동물의 행동에 지장이 없도록 탄력붕

대를 이용하여 몸통을 둘러싼 후 6 시간 폐쇄접포 한다. 7일과 14일에 동일하게 반복 수행한다.

(나) 대조군(0, 7, 14일)

시험군과 동일하나 시험물질 대신 시험물질 용매를 사용한다.

(2) 감작야기(시도단계)

(가) 처리군 및 대조군(28일)

폐쇄접포에 의한 마지막 유도단계가 끝나고 2주 후, 시험동물의 사용하지 않은 한쪽 옆구리(4×4 cm)의 털을 제거하고, 감작야기 농도의 시험물질을 각각 0.5 ml 씩 포함하는 패취를 부착하여 6시간 폐쇄접포 한다. 필요에 따라 1차 감작야기 7일 후 동일한 방법으로 2차 야기를 실시할 수도 있다.

(3) 관찰 및 판정

(가) 시험물질 제거

폐쇄접포 후 6시간째에 패취를 제거하고, 패취제거 후 24시간(필요에 따라 패취제거 후 21시간에 남아있는 시험물질을 미온수로 깨끗이 닦아낸 후 제모하고, 제모 후 3시간), 48시간에 측복부를 관찰한다.

(나) 일반증상 관찰

모든 피부반응, 감작유도 및 감작야기 단계를 거치는 동안 발생한 비정상적인 반응을 관찰한다. 필요에 따라 병리조직학적 검사 및 피부의 두께 등을 측정할 수도 있다.

(다) 체중측정

군분리시, 시험물질 투여 전, 시험 개시 후 주 1회 및 시험종료일에 개체별 체중을 측정한다.

(라) 피부의 관찰 및 평가방법

피부반응 평가기준 <별표 1>에 의해 피부소견의 평가를 실시하고 피부 과민성 평가기준 <별표 2>에 따라 피부과민성의 정도를 평가한다. 대조동물의 감작 시험결과가 모두 1등급 이하이면서 시험물질을 처리한 동물의 과민성 시험결과가 일반적으로 1등급 내지 그 이상 등급의 시험동물은 감작반응을 나타내는 것으로 본다. 대조동물이 1등급 이상으로 나타나면 대조동물의 가장 심한 반응보다 더한 시험동물의 반응은 감작반응으로 인한 것으로 본다.

6. 독성시험결과 및 보고

6.1 결과의 처리

각 단계에서 관찰한 각 동물의 피부 반응을 보여주는 데이터를 표에 요약해야 한다.

6.2 시험결과의 보고

시험 결과의 보고서에는 다음의 항목을 포함한다.

- (1) 시험기관의 명칭 및 소재지
- (2) 시험책임자 및 담당자 성명
- (3) 시험동물 : 종, 시험동물의 수, 연령, 공급원, 사육조건, 각 개체의 사육 조건
- (4) 시험물질 : 물질명과 CAS 번호, 물리적 특성 및 순도, 시험과 관련된 물리 화학적 특성, 시험물질의 안정성
- (5) 시험조건 : 시험기간, 투여용량 수준 및 횟수, 먹이공급 시기

(가) 첩포 부위 준비 방법

(나) 사용된 첩포 물질과 첩포 방법에 대한 세부사항

(다) 시험에 사용될 유도 및 유발 노출 농도와 준비 조사 결과

(라) 시험 물질의 조제 방법, 도포, 제거에 대한 세부사항

(마) 유도 및 유발 노출에 사용된 매개물질과 시험 물질의 농도, 유도 및 유발 노출에 사용된 시험 물질의 총량

(6) 시험결과

(가) 피부반응 평가기준에 따른 각 동물의 점수

(나) 효과의 특성 및 정도에 대한 세부사항

(다) 모든 조직 병리학 검사 결과

(라) 결과의 토의

KOSHA GUIDE
W - 9 - 2021

<별표 1>

피부반응 평가기준

점 수	증 상
0	무반응(No reaction)
1	홍반이 적용부위에 흩어져 나타남(Scattered mild redness)
2	홍반이 적용부위 전체에 나타남(Moderate & diffuse redness)
3	전체적으로 강한 홍반 및 부종이 나타남(Intense redness & swelling)

KOSHA GUIDE
W - 9 - 2021

<별표 2>

피부과민성 평가기준

감작률(%)	등 급(Grade)	분 류(Class)
0~8	I	매우 약함(Weak)
9~28	II	약함(Mild)
29~64	III	보통(Moderate)
65~80	IV	강함(Strong)
81~100	V	매우 강함(Extreme)

※ 감작률(%) = (양성반응을 보인 동물 수 / 전체동물 수) × 100

지침 개정 이력

□ 개정일 : 2021. 10.

- 개정자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 조중래
- 개정사유 : 산업안전보건법령 및 관련 고시 폐지 등 개정
- 주요 개정내용
 - 산업안전보건법 전면개정에 따른 변경내용 반영
 - 고용노동부 고시(화학물질의 유해성·위험성 시험 등에 관한 기준, 고용노동부고시 제2020-57호) 폐지에 따른 국립환경과학원 고시(화학물질의 시험방법에 관한 규정) 인용