

# 화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인(V) (OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS)

## - 피부자극시험 -

인체 피부모델을 이용한 피부자극시험법  
(*In Vitro* Skin Irritation: Reconstructed Human *Epidermis* Test Method)

2014. 04.

화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인(V)

제 · 개정번호	승인일자	주요 내용
-		화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인 제정

# 「화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인」(V) 제정

## 1. 제정이유

가. 화장품 안전성 평가에 있어 국제적으로 동물대체시험법의 요구가 높아지고 있으며, 유럽에서는 화장품 안전성 평가 시 동물실험을 금지시키는 법안이 통과됨.

나. 화장품 산업이 급속하게 과학화, 국제화가 추진되고 있어 화장품에 대한 과학적이고 효율적인 안전성 평가방법 가이드라인이 요구됨.

다. 이에 따라 화장품의 안전성 평가 시 국제적으로 대두되고 있는 동물대체시험법을 고려하여 동물대체시험법에 대한 가이드라인을 제정하고자 함.

## 2. 주요내용

인체 피부모델을 이용한 피부자극시험법

본 가이드라인은 현재까지의 경험과 과학적 사실에 근거하여 식품의약품안전처의 입장을 기술하고 있습니다. 이 가이드라인에 기술된 사항은 법적 효력이 있는 것은 아니며, 법령이나 행정규칙 등에서 정하고 있는 사항 외에는 식품의약품안전처의 권고사항입니다. 이는 새로운 과학적 근거가 있을 경우 개정될 수 있으므로 이러한 사항이 있을 경우 식품의약품안전처에 의견을 제시하여 주시기 바랍니다.

※ 이 가이드라인에 대하여 의견이 있는 경우 아래로 문의하시기 바랍니다.

---

식품의약품안전평가원  
바이오생약심사부 화장품심사과

T.043-719-3604 F.043-719-3600

---

## 목 차

I. 개요 .....	1
II. 용어정의 .....	2
III. 고려사항 및 제한점 .....	4
IV. 시험원리 .....	5
V. 숙련도 확인 .....	6
VI. 시험절차 .....	7
VII. 인체피부모델을 이용한 피부자극시험법구성요소 .....	8
VIII. 자료의 보고 .....	12
참고문헌 .....	14

# 1. 개 요

1. 피부자극은 시험물질을 최대 4시간 동안 적용한 후 피부에 일어나는 가역적인 손상을 지칭한다[UN의 '화학물질의 분류 및 표시에 관한 세계조화시스템 (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, 이하 GHS)'에 의한 정의](1). 본 시험지침서(Test Guideline, 이하 TG 또는 시험지침서)는 UN GHS와 EU CLP(European Commission Regulation on the Classification, Labelling and Packaging of Substances and Mixtures)의 범주 2(category 2)에 해당하는 자극성 물질(단일물질 및 혼합물질)의 유해성 확인을 위한 체외(in vitro) 시험방법을 제공한다(1)(2). GHS의 선택사항인 '범주 3(category 3)'(약한 자극성 물질)을 채택하지 않는 국가에서도 비자극성 물질을 확인하는데 본 시험지침서를 사용할 수 있다. 따라서 각 국가의 규제관리체계 및 물질분류 체계에 맞춰 본 시험지침서를 시험물질의 피부 자극성을 결정하는 기존의 동물 피부자극시험법을 대체하는 독립적인 시험법 또는 단계적 시험전략(tiered testing strategy) 내에서 일부대체시험으로 이용할 수 있다(4).
2. 일반적으로 피부 자극성과 부식성의 평가는 실험동물을 이용하였다[OECD(경제협력개발기구) TG 404번 : 1981년 채택, 1992년 및 2002년 개정](4). 동물복지에 대한 관심이 높아짐에 따라, TG 404번 부속서에서는 동물의 고통과 통증을 피하기 위하여 검증된 *ex vivo* 또는 *in vitro* 시험법을 이용하여 피부 부식성 및 자극성을 판별하는 단계적 시험전략을 추천하고 있다. 검증된 3가지 피부 부식성 동물 대체시험법이 TG 430번, 431번, 435번으로 채택되었으며 TG 404번 부속서에서 제안된 단계적 시험전략에서 부식성 평가를 위해 이용하게 되었다(4)(5)(6)(7).
3. 본 시험지침서는 피부 자극성에 대한 내용을 다루고 있다. 본 시험법은 인체 피부 표피(epidermis)의 생화학적, 생리학적 특성을 매우 유사하게 모방한 인체 피부모델(reconstructed human epidermis) 시험계를 기반으로 하고 있다. 인체 피부모델 시험계는 피부의 전형적인 조직 및 세포구조의 특성을 유지하기 위해 인체유래 비형질전환 각질세포(human derived non-transformed keratinocytes)를 사용하고 있다.
4. 인체피부모델을 이용한 4가지의 상용화된 시험법에 대하여 사전검증, 최적화, 검증 연구가 완료되었다(11)(12)(13)(14)(15)(16)(17)(18)(19)(20)(21)(22)(23)(24)(35)(36) (37)(38)(39). 본 시험지침서에는 이 4가지 시험법이 포함되어 있고, 부록 1에 4가지 시험법의 검증연구에 대한 설명이 포함되어 있다.

## II. 용어정의

1. **정확성(Accuracy)** : 시험결과와 참고치(accepted reference values)의 일치 정도. 시험 수행에 대한 평가 척도이고 상관성(relevance)의 한 측면이다. 정확성은 정확하게 맞춘 시험결과의 비율을 의미하는 "일치성(concordance)"과 같은 의미로 쓰인다(10).
2. **세포생존율(Cell viability)** : 세포 군집(cell population)의 총 활성도를 측정하는 지표[예, 세포 내 미토콘드리아의 탈수소 효소가 생체 염료인 MTT (3-(4,5-Dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Thiazolyl blue)를 환원하는 능력]로서 살아있는 세포의 활성도 및 총 숫자와 관련 있으며, 측정된 평가 항목과 시험방법에 따라 다를 수 있다.
3. **화학물질(Chemical)** : 단일물질 또는 혼합물
4. **일치성(Concordance)** : 상관성의 한 측면을 보여주고 시험법이 시험물질을 자극성·비자극성 등의 범주로 나누는 수행에 대한 평가 척도. 이 용어는 정확성과 같은 의미로 사용되며 시험에 사용한 모든 시험물질이 양성 또는 음성으로 정확하게 분류되는 비율로 정의된다. 시험법의 특이성 또는 민감도를 우선시하는 척도에 따라 시험에 사용 될 양성물질 비율이 조절되는데, 일치성 또한 이에 따라 달라진다(10).
5. **ET<sub>50</sub>** : 기준물질을 정해진 농도로 처리했을 때 세포 생존율을 50%까지 감소시키는데 필요한 노출시간으로 결정(IC<sub>50</sub> 참조).
6. **EU CLP(European Commission Regulation on the Classification, Labelling and Packaging of Substances and Mixtures, 단일물질과 혼합물의 분류, 표시, 포장에 대한 유럽집행위원회 규제)** : 화학물질(단일물질 또는 혼합물) 분류를 위해 UN GHS 체계를 유럽연합(European Union, EU)에서 적용한 것(3).
7. **GHS[Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals by the United Nations (UN), 유엔의 화학물질의 분류 및 표시에 관한 세계조화시스템]** : 사람(고용주, 근로자, 운송자, 소비자, 응급처치자 등)과 환경을 보호하고 화학물질의 유해한 영향에 대한 정보를 전달하기 위해, 물리적, 보건적, 그리고 환경적 위험의 표준화된 유형과 수준에 따른 화학물질(단일물질 또는 혼합물)의 분류체계이며 pictogram, 표시방법, 위해에 대한 사항, 사전주의 사항, 안전성 자료 기록지와 같은 해당하는 소통 방식에 적절한 체계이다(1).

8. **IC<sub>50</sub>** : 기준물질을 일정 시간 동안 노출시켰을 때 세포 생존율을 50%까지 감소 시키는데 필요한 농도 또는 용량으로 결정(ET<sub>50</sub> 참조).
9. **무제한 용량(Infinite dose)** : 피부 표피의 표면을 균일하게 완전히 덮는 데 필요한 양을 초과하여 표피에 적용한 시험물질의 양.
10. **유사시험법(Me-too test)** : 검증되고 허용된 기준 시험법과 구조적, 기능적으로 유사한 시험법의 구어적 표현(10).
11. **혼합물질(Mixture)** : 서로 반응하지 않는 2가지 이상의 물질로 구성된 혼합물 또는 용액.
12. **시험법평가기준(Performance standards, PS)** : 검증된 시험법에 기반하여 제안된 시험법이 검증된 시험법과 기술적, 기능적으로 유사한 정도를 평가하기 위해 제공되는 표준기준. 여기에는 (1) 필수적인 시험법의 구성요소, (2) 검증된 시험법이 수행에 적합하다는 것을 증명하는데 사용된 시험물질 중에서 선택한 최소한의 참고물질 목록, (3) 최소한의 참고물질 목록을 이용하여 제안된 시험법을 평가하였을 때 제안된 시험법이 증명해야 하는 정확성 및 신뢰성의 수준. 이러한 정확성 및 신뢰성은 기존의 검증된 시험법에서 얻어진 수준을 근거로 함(10).
13. **참고물질(Reference chemicals)** : 관심의 대상이 되는 종(species)이나 참고할 수 있는 *in vitro* 또는 *in vivo* 시험계(reference test system)에서의 반응이 이미 알려져 있고, 검증과정에서 선택되어 이용된 시험물질. 이 물질들은 시험법이 사용될 것으로 예상되는 시험물질 종류를 대표해야 하며, 시험물질이 일으킬 것으로 예상되는 반응의 모든 범위(강, 약, 음성)를 나타내야 한다. 검증절차의 단계, 시험법 및 시험목적에 따라 다른 참고물질 목록이 필요할 수도 있다(10).
14. **상관성(Relevance)** : 시험법과 관심있는 결과 사이의 관계에 대한 기술. 특정 목적을 위한 시험법의 유용성 여부에 대한 기술로서 해당 시험법이 관심있는 생물학적인 영향을 정확하게 측정하거나 예측하는 정도로 상관성은 시험법의 정확성(일치성)을 포함한다(10).
15. **신뢰도(Reliability)** : 동일한 시험방법에 따라 반복 시행하였을 때 동일 실험실과 다른 실험실에서 시험법을 재현할 수 있는 정도. 신뢰도는 실험실 내 실험실 간 재현성(reproducibility)으로 평가된다(10).
16. **대체시험(Replacement test)** : 유해성 확인이나 위해성 평가를 위하여 일상적으로 사용하는 시험을 대체하기 위하여 고안된 시험. 인체나 동물의 건강 또



는 환경을 보호하기 위하여, 모든 가능한 시험상황과 물질을 고려하여 기존의 방법과 비교하였을 때 동등한 또는 개선된 방법을 사용한다(10).

17. **민감도(Sensitivity)** : 시험결과로 양성물질이 양성물질로 정확하게 분류된 비율. 시험물질의 범주를 결정하는 시험법에 대한 정확성의 척도이며 시험법의 상관성을 평가하는데 중요한 고려사항이다(10).

18. **피부자극(Skin irritation)** : 시험물질을 최대 4 시간 동안 적용하였을 때 피부에 나타나는 가역적 손상. 피부 자극은 영향을 받은 피부조직에서 나타나는 국소반응이며 자극을 받은 직후에 나타난다(30). 피부자극은 피부조직의 선천성 면역체계(비특이적)와 연계된 국소염증반응에 의해 일어난다. 염증반응과 자극의 주요 임상증상인 홍반, 부종, 가려움, 통증을 포함하는 가역적인 반응이 주된 특징이다.

19. **특이성(Specificity)** : 시험 결과로 음성물질이 음성물질로 정확하게 분류되는 비율. 시험물질의 범주를 결정하는 시험법에 대한 정확성의 척도이며 시험법의 상관성을 평가하는데 중요한 고려사항이다(10).

20. **물질(Substance)** : GHS (1)에서 규정한 것과 같이 생산과정을 통해 얻어지거나 또는 천연상태로 얻는 화학 원소(element)와 화합물(compound). 생산물의 안정성을 유지시키는데 필요한 모든 첨가제와 생산 과정에서 유래하는 모든 불순물을 포함한다. 그러나 해당물질의 안정성이나 그 조성의 변화에 영향을 주지 않고 분리 될 수 있는 용매는 제외한다.

21. **단계적 시험전략(Tiered testing strategy)** : 순차적인 방식으로 시험법을 사용하여 시험하는 것. 이전 단계의 시험결과에 따라서 다음 단계의 시험법이 결정된다(10).

### III. 고려사항 및 제한점

1. 본 시험지침서의 제한점은 인체피부모델을 이용한 시험법을 평가한 검증연구에서 입증된 바와 같이, GHS 선택사항인 '범주 3'(약한 자극성 물질)에 속하는 시험물질의 분류에는 사용될 수 없다는 것이다(1)(17). 따라서 국가의 관리체계 안에서 본 시험지침서를 어떻게 사용할 지를 결정해야 할 것이다. 부분적인 대체시험법으로 사용하고자 한다면 피부자극 잠재성을 정확히 평가하기 위하여 추가

적으로 체내 시험법(in vivo testing)이 필요할 수도 있다. 인체 피부의 사용은 윤리적 문제를 고려하여야 한다.

2. 본 시험지침서는 피부 부식성 및 자극성에 대한 시험지침서 TG 404 부속서에 제안된 단계적 시험전략 중 체외피부자극시험(in vitro skin irritation)을 다루고 있다(4). 본 시험지침서는 피부 부식성에 대한 충분한 정보를 제공하지 않지만, 피부 부식성에 대한 시험지침서 TG 431이 동일한 인체피부모델 시험계를 기반으로 하고 있다(6). 본 시험지침서는 인체 각질세포를 이용한 인체피부모델에 기반하고 있고, 이는 사람의 체외표적기관(in vitro the target organ)에 해당한다. 더욱이 생체 내 자극 시 발생하는 염증의 연쇄반응 및 작용기전에 대한 초기단계(국소 외상을 일으키는 세포 및 조직 손상)를 직접적으로 포함한다. 본 시험지침서의 기반이 되는 검증에서 다양한 종류의 시험물질들이 시험되었으며, 검증연구에 대한 실험기반의 데이터베이스에는 총 58개 물질이 포함되어 있다(17)(19)(24). 본 시험지침서는 고체, 액체, 반고체, 왁스에 적용할 수 있다. 액체는 수용성 또는 비수용성, 고체는 물에 가용성 또는 불용성일 수 있다. 가능하다면 고체는 고운 분말로 갈아서 처리하며 다른 전처리는 필요하지 않다. 기체와 에어로졸은 아직 검증연구에서 평가되지 않았다(25). 현재의 시험지침서는 기체와 에어로졸에 대한 시험에 대해 허용되지 않는다. 강하게 착색된 물질은 세포 생존율 측정을 간섭할 수 있으므로 보정용 대조군 사용이 필요할 수도 있다(VII. 라. 참조).
3. 시험물질에 대한 분류가 명확하면, 3 개의 반복시료(three replicate tissues)의 단위 시험으로 충분하다. 그러나 3 반복 시료의 결과가 서로 일치하지 않거나 평균 생존율이  $50 \pm 5\%$  등의 경계치의 결과가 나온 경우에는 2차 시험 수행을 고려해야 한다. 또 앞선 두 번의 결과가 일치하지 않는 경우에는 3차 시험을 수행한다.

## IV. 시험원리

1. 시험물질은 비형질전환 인체유래 표피 각질세포로 구성된 3차원(three-dimensional) 인체피부모델에 국소적(topically)으로 적용된다. 인체피부모델은 각질세포를 고도로 분화된 여러 층의 인체 표피의 모델이 형성될 때까지 배양한 것이다. 이는 기저층, 유극층(또는 가시층)과 과립층, 그리고 체내에 분포하는 지방 중 주요 부

류인 세포간 판상형 지방층(lamellar lipid layer)을 포함하는 다층의 각질층(a multilayered *stratum corneum*)으로 구성된다.

2. 홍반과 부종이 주요 특징인 화학물질에 의한 피부자극은 화학물질이 각질층을 투과하여 시작되는 연쇄반응의 결과로 각질세포와 다른 피부세포의 기초가 되는 부분을 손상시킬 수 있다. 손상을 입은 세포는 염증을 일으키는 매개물질들은 분비하거나 염증의 연쇄반응을 일으키는데 이 반응은 진피층의 세포(특히 혈관의 기질 세포와 내피세포)에 작용한다. 내피세포의 확장과 투과성의 증가가 홍반과 부종을 일으킨다(25). 시험계 내에 혈관생성능력이 없는 인체피부모델 기반의 시험법은 세포/조직 손상 등의 연쇄반응의 시작을(17)(18) 세포생존율로 판독한다.
3. 인체피부모델에서 세포생존율은 생체염료인 MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Thiazolyl blue; CAS No. 298-93-1]가 효소에 의하여 청색의 포르마잔염(formazan salt)으로 전환되는 것을 조직에서 추출하여 정량적으로 측정한다(25). 자극성 물질은 정해진 역치 수준(즉,  $\leq 50\%$ 이면 GHS '범주 2') 이하로 세포생존율을 감소시키는 것으로 확인할 수 있다. 각 국가의 규제관리체계와 본 시험지침서의 적용도에 따라 시험물질이 정해진 역치 수준 이상의 세포생존율을 나타내면 비자극성 물질로 간주할 수 있다[즉,  $> 50\%$  이면 범주 외(비자극)].

## V. 숙련도 확인

1. 각 실험실은 본 시험지침서(부록 1)에 있는 4가지 인체피부모델 시험법 중 어느 하나를 일상적으로 사용하기 전에 표 1에 제시된 10개의 시험물질을 이용하여 기술적 숙련도를 증명하여야 한다.
2. 숙련도 시험의 일부로서, 인체피부모델 공급자로부터 조직을 수령한 후, 제공한 정보의 조직 장벽 특성(barrier properties)이 확인되어야 한다. 이 절차는 특히 조직이 장거리를 장시간에 걸쳐 운송되었을 때 중요하다. 시험법이 성공적으로 확립되고, 숙련도가 증명되면 조직 장벽 특성의 확인은 각 시험마다 실시될 필요는 없다. 그러나 시험법을 일상적으로 사용하는데 있어서 장벽 특성에 대해 정기적으로 점검할 것을 권장한다.

표 1. 숙련도 확인용 시험물질(Proficiency Chemicals)<sup>1</sup>

시험물질	CAS 번호	<i>in vivo</i> 점수 <sup>2</sup>	물리적 성상	GHS 범주
<b>범주 외 화학물질(NON-CLASSIFIED CHEMICALS)</b>				
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 (선택성 범주 3) <sup>3</sup>
hexyl salicylate	6259-76-3	2	액체	범주 외 (선택성 범주 3) <sup>3</sup>
<b>범주 2로 분류된 화학물질(CLASSIFIED CHEMICALS)</b>				
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

<sup>1</sup>본 시험물질들은 검증시험에서 사용된 물질들의 일부임.

<sup>2</sup>OECD TG 404에 따른 *in vivo* 점수(4).

<sup>3</sup>본 시험지침서에서 GHS의 선택사항인 '범주 3'(약한 자극성물질)(1)은 범주 외(비자극성물질)로 간주.

## VI. 시험절차

피부 자극성 평가를 위한 '인체피부모델을 이용한 피부자극시험법'의 구성요소와 시험방법이 아래에 기술되어 있다(부록 2 참조). 본 시험지침서에 기술된 4가지

시험법에 대한 표준작업지침서(Standard Operating Procedures)가 참고 가능하다 (27)(28)(29)(40).

## VII. 인체피부모델을 이용한 피부자극시험법 구성요소

### 1. 일반적인 조건(General conditions)

비형질전환 인체 각질세포는 상피조직(epithelium)을 재구성하기 위해 이용된다. 살아있는 상피세포의 다층구조[기저층, 유극층(가시층), 과립층]는 각질층 아래에 존재해야 한다. 각질층은 세포독성 기준물질(benchmark chemical)(예, sodium dodecyl sulfate(SDS) 또는 Triton X-100)의 빠른 투과를 저해하는 견고한 장벽 역할을 하는 필수 지방층이 포함된 다층 구조이어야 한다. 이러한 장벽 기능은 증명되어야 하며, 이는 기준물질이 정해진 노출시간 후에 조직의 생존율을 50% 감소시키는 농도(IC<sub>50</sub>), 또는 기준물질을 정해진 농도로 투여했을 때 세포생존율을 50% 감소시키는 노출시간(ET<sub>50</sub>)으로써 평가할 수 있다. 이러한 인체피부모델의 방어 특성은 각질층 주위의 물질들이 살아있는 조직으로 투과되는 것을 막는 것으로, 투과가 될 경우 피부 노출에 적합하지 않은 모델이 된다. 또한, 인체피부모델은 세균, 바이러스, 미코플라스마, 진균 등에 오염되지 않아야 한다.

### 2. 기능적인 조건(Functional conditions)

#### 1) 생존율(Viability)

시험방법은 세포생존율을 결정하기 위해 MTT 시험법을 이용한다(26). 사용자는 인체피부모델의 각 배치가 음성대조군의 흡광도 값이 허용범위 기준에 부합하는지 확인해야 한다. 추출용매의 흡광도는 0.1 미만[OD(optical density)<0.1]이어야 한다. 인체피부모델의 개발자/공급자는 음성대조군의 흡광도 값(피부자극시험법 조건에서)의 허용범위(상한 및 하한)를 지정한다. 4가지 인체피부모델 시험법의 음성대조군 흡광도 허용범위는 표 2와 같다. 음성대조군이 처리된 조직이 시험의 노출기간 동안 안정적으로 배양되었다는 것(유사한 세포생존율을 유지하는 것)을 기록해 남겨야 한다.

표 2. 본 시험지침서에 포함된 시험법의 음성대조군 OD값 허용범위

	최소 허용치 (Lower acceptance limit)	최대 허용치 (Upper acceptance limit)
EpiSkin™ (SM) <sup>1</sup>	≥ 0.6	≤ 1.5
EpiDerm™ SIT <sup>2</sup> (EPI-200)	≥ 0.8	≤ 2.8
SkinEthic™ RHE	≥ 0.8	≤ 3.0
LabCyte EPI-MODEL24SIT	≥ 0.7	≤ 2.5

<sup>1</sup> SM: Standard Model

<sup>2</sup> SIT: Skin Irritation Test

## 2) 장벽 기능(Barrier function)

각질층과 각질층의 지질 구성은 SDS나 Triton X-100과 같은 세포독성 기준 물질(cytotoxic benchmark chemicals)의 빠른 투과(IC<sub>50</sub> 또는 ET<sub>50</sub> 값으로 계산)를 충분히 저해할 수 있어야 한다(표 3).

## 3) 형태학(Morphology)

인체 표피와 유사한 구조(다층의 각질층 포함)임을 증명하기 위한 인체피부 모델의 조직학적 검사를 수행하여야 한다.

## 4) 재현성(Reproducibility)

시험법의 양성대조군과 음성대조군의 결과는 반복적인 실험에서 재현성을 보여야 한다.

## 5) 품질관리(Quality control)

개발자/공급자가 인체피부모델의 각 배치가 정해진 생산 출하 기준에 적합하다는 것을 확인하고 증명했을 때만 해당 인체피부모델을 사용할 수 있다. 이러한 기준은 생존율[VII. 나. 1)], 장벽 기능[VII. 나. 2)], 형태학[VII. 나. 3)]에 영향을 주는 것들이다. 이러한 자료는 사용자에게 제공되어야 하며, 사용자들이 이 자료를 시험보고서에 포함할 수 있도록 해야 한다. 인체피부모델의 개발자/공급자는 IC<sub>50</sub> 또는 ET<sub>50</sub> 값의 허용범위(상한과 하한)를 확립하여야 한다. 품질보증된 조직을 이용하여 얻은 결과만이 자극성 물질 분류에서 신뢰성 있는 예측으로 인정될 수 있다. 본 시험지침서에 포함된 검증된 4가지 시험법의 허용범위가 표 3에 제시되어 있다.

표 3. 본 시험지침서에 포함된 시험법의 QC 배치 출하 기준

	최소 허용치 Lower acceptance limit	최대 허용치 Upper acceptance limit
EpiSkin™ (SM) <sup>1</sup> (SDS로 18 시간 처리) (27)	IC <sub>50</sub> = 1.0 mg/mL	IC <sub>50</sub> = 3.0 mg/mL
EpiDerm™ SIT <sup>2</sup> (EPI-200) (1% Triton X-100) (28)	ET <sub>50</sub> = 4.0 hr	ET <sub>50</sub> = 8.7 hr
SkinEthic™ RHE (1% Triton X-100) (29)	ET <sub>50</sub> = 4.0 hr	ET <sub>50</sub> = 10.0 hr
LabCyte EPI-MODEL24SIT (SDS로 18시간 처리) (40)	IC <sub>50</sub> = 1.4 mg/mL	IC <sub>50</sub> = 4.0 mg/mL

<sup>1</sup> SM: Standard Model

<sup>2</sup> SIT: Skin Irritation Test

### 3. 시험물질과 대조물질의 적용(Application of the Test and Control Chemicals)

- 1) 매회 실험에서 각각의 시험물질과 대조물질에 대하여 각 시험법 당 최소한 3 반복 실험을 진행하여야 한다. 충분한 양의 시험물질(액체 및 고체물질)이 표피 표면을 균일하게 덮을 수 있도록 처리하되[예, 26 ~ 83  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$  또는  $\text{mg}/\text{cm}^2$ (부록 2 참조)], 무제한 용량(infinite dose)으로 처리하는 것은 피한다. 고체시험물질의 경우, 시험물질과 표피 표면 사이의 접촉을 용이하게 하기 위해 시험물질을 표면에 처리하기 전에 조직 표면을 탈이온수나 증류수로 적신다. 가능한 고체는 고운 분말로 시험해야 한다. 특정 경우에는 물질을 적용하는 도구로 나일론 메시를 사용할 수 있다(부록 2 참조). 노출시간 종료 후, 시험물질을 처리한 표피 표면을 수용성 완충액이나 0.9% 염화나트륨 용액으로 조심스럽게 세척한다. 사용하는 '인체피부모델을 이용한 피부자극시험법'에 따라 노출시간은 15 ~ 60분, 배양온도는 20 ~ 37°C에서 결정된다. 이 노출시간과 배양온도는 각각의 '인체피부모델을 이용한 피부자극시험법'에 최적화되어 있다(부록 2 참조).
- 2) 매회 실험마다 음성대조군과 양성대조군을 병행하여 생존율(음성대조군 기준), 피부조직의 장벽 기능, 실험 후 피부조직의 민감도(양성대조군 기준)가 기존의 실험으로부터 축적된 결과를 통해 정해진 허용범위(historical acceptance range) 내에 있다는 것으로 보여야 한다. 양성대조물질은 5% 수용성 SDS 용액, 음성대조물질로는 물 또는 인산염완충액(phosphate buffered saline)을 추천한다.

#### 4. 세포 생존율의 측정(Cell Viability Measurements)

- 1) 시험과정 중 시험물질에 노출 종료 후 곧바로 생존율을 측정하지 않고 조직을 새 배지로 세척한 다음 충분한 배양시간이 지난 후에 측정하는 것이 중요하다. 이러한 배양시간을 통해 약한 세포독성의 영향은 회복시키고, 뚜렷한 세포독성은 나타나도록 한다. 본 시험지침서에 있는 두 가지 방법의 시험 결과, 최적의 배양시간은 42시간으로 확인되었다(12)(13)(14)(15)(16).
- 2) 본 시험지침서에서 MTT 시험법은 세포 생존율을 측정하는데 이용된다. MTT 시험법은 3차원 조직 구조에서 사용가능하다. 조직 표본을 적당한 농도(예, 0.3 ~ 1 mg/mL)의 MTT 용액에 3시간 동안 놔두면 생존한 세포는 MTT를 청색의 포르마잔으로 바꾸게 되고, 석출된 청색의 포르마잔 생성물을 용매(예, isopropanol, acidic propanol)를 이용하여 조직으로부터 추출한다. 포르마잔의 농도는 570 nm(570 ± 30 nm 필터) 파장에서의 흡광도 값으로 결정된다.
- 3) 시험물질의 광학성질 또는 MTT 시약과의 직접적인 화학반응으로 인해 발색 과정을 간섭하면 생존율 측정에 오류가 생길 수 있다. 이러한 현상은 특정 시험물질이 세척과정에서 완전히 제거되지 않았거나 표피에 침투되었을 때 나타날 수 있다. 만약 시험물질이 MTT 반응에 직접 작용하거나(MTT 환원제), 원래 색상이 있거나, 시험물질의 조직 처리 중에 색상이 변한다면, 추가적인 대조군을 이용하여 생존율 측정을 간섭하는 요인을 찾아내어 보정을 해야 한다. 직접적인 MTT 환원과 착색제에 의한 간섭을 보정하는 방법에 대한 설명은 본 시험지침서에 포함된 4가지 검증된 시험법의 표준작업지침서에 기술되어 있다(27)(28)(29)(40).

#### 5. 허용 기준(Acceptability Criteria)

품질 보증된 인체피부모델 배치[VII. 나. 5) 참조]를 이용한 각 시험법에서 음성대조물질로 처리된 조직은 모든 시험과정 후의 조직의 품질을 반영하는 흡광도 값을 보여야 한다. 음성대조군의 흡광도 값은 기존 시험결과로부터 추적되어 확립된 허용치 미만이어서는 안 된다. 마찬가지로 각 시험법의 조건하에서 양성대조물질(예, 5% 수용성 SDS 용액)로 처리된 피부조직은 자극성 물질에 반응하는 특성을 나타내야 한다. 시험법 당 반복시험의 결과에 대한 상관성과 타당성은 결과의 표준편차가 시험법에 설정된 허용범위 안에 들어가는지 여부에 따라 판단한다(부록 2 참조).



## 6. 결과의 해석과 예측 모델(Interpretation of Results and Prediction Model)

각 시험물질로부터 얻은 흡광도 값은 음성대조물질(생존율을 100%로 정함)로 부터의 결과로 표준화하여 생존율(%)로 계산한다. 자극성 물질과 비자극성 물질을 구별하는 세포생존율 기준치(cut-off value)와 자극성 물질의 식별 및 결과 평가에 사용하는 통계절차는 명확히 정의되어, 문서화되고, 타당하게 증명되어야 한다(시험법의 표준작업지침서 참고). 자극성 물질을 예측하는데 사용되는 기준치는 다음과 같다.

- 만약 피부모델에 시험물질을 처리하고 세척하여 배양한 후에 조직 생존율이 50% 이하( $\leq$ )이면 그 물질은 GHS '범주 2'에 해당하는 피부 자극성 물질로 간주한다.
- 만약 피부모델에 시험물질을 처리하고 세척하여 배양한 후에 조직 생존율이 50%를 초과(>)하면 그 물질은 각 국가의 규제관리체계에 따라 GHS '범주 외'에 해당하는 피부 비자극성 물질이라고 간주할 수 있다.

## VIII. 자료의 보고

### 1. 자료(Data)

매 실험에서, 반복시험으로부터 얻은 개별 데이터(예, 각 시험물질에 대한 흡광도 값과 세포생존율 데이터, 자극성 분류결과)는 표의 형식으로 보고한다. 또한, 매 실험의 평균 $\pm$ 표준편차가 보고되어야 한다. 각 시험물질에 대해, MTT 시약과의 관찰된 반응성과 색상 등도 보고해야 한다.

### 2. 시험보고서(Test Report)

시험보고서는 다음의 정보를 포함하여야 한다.

#### 1) 시험물질과 대조물질 :

- CAS(Cheical Abstract Service) 등록명과 등록번호와 같은 화학물질명(알려져 있을 경우)
- 화학물질의 순도 및 조성(중량 백분율)
- 시험수행과 관련된 물질의 물리화학적 성질[예, 물리적 성상, 안정성, 휘발

성, pH, 수용성(알려져 있을 경우)]

- 해당하는 경우, 시험 및 대조물질의 시험 전 처리 사항(예, 가온, 분쇄)
- 보관 조건

## 2) 인체피부모델과 시험법 선정 근거

### 3) 시험조건 :

- 사용된 세포계
- 특정 인체피부모델의 수행능력을 포함한 상세한 배경 정보  
최소한 다음 사항을 포함해야 함
  - i) 생존율
  - ii) 장벽 기능
  - iii) 형태학
  - iv) 재현성과 예측성
  - v) 모델의 품질관리(QC)
- 사용된 시험과정의 세부사항
- 사용된 시험물질의 용량, 노출시간, 처리 후 배양시간
- 시험절차 상의 모든 수정사항에 대한 기술
- 해당 모델 이력  
최소한 다음 사항을 포함해야 함
  - i) 모델 배치 이력(historical batch data)과 관련된 품질관리 데이터 허용범위
  - ii) 양성대조군과 음성대조군의 평균 및 범위를 참고한 양성 및 음성 대조군의 허용 범위
- 예측 모델에서 자극성 분류 기준치의 설정 근거를 포함하여 판정기준에 대한 설명
- MTT 환원제 또는 발색된 화학물질에 사용된 추가 대조군에 대한 설명

## 4) 시험결과

- 각 시험물질의 시험에서 얻은 개발 결과치, 평균, 표준편차, 최종 분류결과에 대한 도표
- MTT 시험법에 사용된 대조군 결과
- 기타 관찰된 현상에 대한 설명

## 5) 시험결과의 토의

## 6) 결론

## 참고문헌

- (1) UN (2009), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Third revised edition, UN New York and Geneva.
- (2) EC-ECVAM (2009), Statement on the “Performance under UN GHS of three in vitro assays for skin irritation testing and the adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM skin irritation Performance Standards”, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 9 April 2009.
- (3) EC (2008), REGULATION (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006. Official Journal of the European Union L353, 1-1355.
- (4) OECD (2004), *Acute Dermal Irritation/Corrosion*, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 404, OECD, Paris.
- (5) OECD (2004), *In Vitro Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance (TER)*, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 430, OECD, Paris.
- (6) OECD (2004), *In Vitro Skin Corrosion: Human Skin Model Test*, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 431, OECD, Paris.
- (7) OECD (2006), *In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion*, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 435, OECD, Paris.
- (8) EC-ECVAM (2009), Performance Standards for in vitro skin irritation test methods based on Reconstructed human Epidermis (RhE).
- (9) EC-ECVAM (2009), ESAC Statement on the Performance Standards (PS) for in vitro skin irritation testing using Reconstructed human Epidermis, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 8 July 2009.
- (10) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, OECD Series

on Testing and Assessment No. 34, OECD, Paris.

(11) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J. M. and Botham, P. (2001), A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation. Results and evaluation by the Management Team, *Toxicol. in Vitro* 15, 57-93.

(12) Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. and Roguet, R. (2002), Refinement of the EPISKIN protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: follow-up to the ECVAM prevalidation study, *Toxicol. in Vitro* 16, 765 - 770.

(13) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. and Spielmann, H. (2004), Optimisation of the EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests, *ALTEX* 21, 107 - 114.

(14) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. and Spielmann, H. (2005), The EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests - An assessment of the performance of the optimised test, *ATLA* 33, 351-367.

(15) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. and Rubinstenn, G. (2005), The *in vitro* acute skin irritation of chemicals: optimisation of the EPISKIN prediction model within the framework of the ECVAM validation process, *ATLA* 33, 329-349.

(16) Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. and Worth, A. (2002), Follow-up to the ECVAM prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, *ATLA* 30, 109-129.

(17) Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J.-H., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: Report on the validity of the EPISKIN

- and EpiDerm assays and on the skin integrity function test, *ATLA* 35, 559-601.
- (18) Hoffmann, S. (2006), ECVAM skin irritation validation study phase II: Analysis of the primary endpoint MTT and the secondary endpoint IL1- $\alpha$ .
- (19) Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: selection of test chemicals, *ATLA* 35, 603-619.
- (20) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonnaud, E. and Leclaire, J. (2007), *In vitro* acute skin irritancy of chemicals using the validated EPISKIN model in a tiered strategy - Results and performances with 184 cosmetic ingredients, *AATEX*, 14, 351-358.
- (21) EC-ECVAM (2007), Statement on the validity of *in vitro* tests for skin irritation, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 April 2007.
- (22) EC-ECVAM (2007), Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation testing.
- (23) EC-ECVAM (2008), Statement on the Scientific validity of *in vitro* tests for skin irritation testing, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5 November 2008.
- (24) OECD (2010), Explanatory background document to the OECD draft Test Guideline on *in vitro* skin irritation testing. Published in OECD Series on Testing and Assessment, No. 137, OECD, Paris.
- (25) Welss, T., Basketter, D.A. and Schröder, K.R. (2004), *In vitro* skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models, *Toxicol. in Vitro* 18, 231-243.
- (26) Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
- (27) EpiSkin™ SOP, Version 1.8 (February 2009), ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ test method 15 min - 42 hours for the prediction of acute skin irritation of chemicals.

- (28) EpiDerm™ SOP, Version 7.0 (Revised March 2009), Protocol for: *In vitro* EpiDerm™ skin irritation test (EPI-200-SIT), For use with MatTek Corporation's reconstructed human epidermal model EpiDerm (EPI-200).
- (29) SkinEthic™ RHE SOP, Version 2.0 (February 2009), SkinEthic skin irritation test-42bis test method for the prediction of acute skin irritation of chemicals: 42 minutes application + 42 hours post-incubation.
- (30) Harvell, J.D., Lamminstausta, K., and Maibach, H.I. (1995), Irritant contact dermatitis, *In: Practical Contact Dermatitis*, pp 7-18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.
- (31) EC (2001), Commission Directive 2001/59/EC of 6 August 2001 adapting to technical progress for the 28th time Council Directive 67/548/EEC on the approximation of laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances, Official Journal of the European Union L225, 1-333.
- (32) Basketter, D.A., York, M., McFadden, J.P. and Robinson, M.K. (2004), Determination of skin irritation potential in the human 4-h patch test. *Contact Dermatitis* 51, 1-4.
- (33) Jirova, D., Liebsch, M., Basketter, D., Spiller, E., Kejlova, K., Bendova, H., Marriott, M. and Kandarova, H. (2007), Comparison of human skin irritation and photo-irritation patch test data with cellular *in vitro* assays and animal *in vivo* data, *AATEX*, 14, 359-365.
- (34) Jírová, D., Basketter, D., Liebsch, M., Bendová, H., Kejlová, K., Marriott, M. and Kandárová, H. (2010), Comparison of human skin irritation patch test data with *in vitro* skin irritation assays and animal data, *Contact Dermatitis*, 62, 109-116.
- (35) Katoh, M., Hamajima, F., Ogasawara, T. and Hata K. (2009), Assessment of human epidermal model LabCyte EPI-MODEL for *in vitro* skin irritation testing according to European centre for the validation of alternative methods (ECVAM)- Validated Protocol, *J Toxicol Sci*, 34, 327-334
- (36) Katoh, M. and Hata K. (2011), Refinement of LabCyte EPI-MODEL24 skin Irritation test method for adaptation to the requirements of OECD test

guideline 439, AATEX, 16, 111-122

(37) OECD (2011), Validation report for the skin irritation test method using LabCyte EPI-MODEL24, OECD Series on Testing and Assessment No. 159, OECD, Paris.

(38) OECD (2011), Peer review report of validation of the skin irritation test using LabCyte EPI-MODEL24, OECD Series on Testing and Assessment No. 155, OECD, Paris.

(39) Kojima, H., Ando, Y., Idehara, K., Katoh, M., Kosaka, T., Miyaoka, E., Shinoda, S., Suzuki, T., Yamaguchi, Y., Yoshimura, I., Yuasa, A., Watanabe, Y. and Omori, T. (2012), Validation Study of the In Vitro Skin Irritation Test with the LabCyte EPI-MODEL24, *Altern Lab Anim*, 40, 33-50.

(40) LabCyte EPI-MODEL24 SIT SOP, Version 8.3 (June 2011), Skin irritation test using the reconstructed human model "LabCyte EPI-MODEL24"

## 부록 I

### (본 시험지침서에 포함된 시험법)

번호	시험법명	검증연구 유형	참고자료
1	<b>EpiSkin™</b>	실험만으로 수행된 검증연구(2003~2007년). 본 시험법은 ECVAM의 유사시험법평가기준 제정본 및 개정본의 주요 시험법 내용을 정의하는데 사용되었다(8)(9)(22)*. 더 나아가 이 방법의 비분류물질과 분류 물질에 대한 검증자료는 최초의 유사시험법평가기준*의 특이성과 민감도 수치를 정하는데 주요 근거가 되었다.	(2)(8)(9)(11)(12)(15) (16)(17)(18)(19)(20) (21)(22)(24)(27)
2	<b>EpiDerm™ SIT (EPI-200)</b>	EpiDerm™(초기모델) : 처음에 이 시험법은 검증 연구를 2003~2007년에 EpiSkin™과 함께 진행되었다. 본 시험법은 ECVAM의 유사시험법평가기준 제정본 및 개정본의 주요 시험법 내용을 정의하는데 사용되었다(8)(9)(22)*. EpiDerm™ SIT(EPI-200) : 초기 EpiDerm™의 변형된 방법으로 2008년에 ECVAM 유사시험법평가기준 제정본을 이용하여 검증되었다(22).	(2)(8)(9)(11)(13)(14) (16)(17)(18)(19)(21) (22)(23)(24)(28)
3	<b>SkinEthic™ RHE</b>	2008년 ECVAM 유사시험법평가기준 제정본을 기반으로 검증연구를 수행하였다(22).	(2)(22)(23)(24)(29)
4	<b>LabCyte EPI-MODEL24 SIT</b>	ECVAM 유사시험법평가기준 개정본*을 기반으로 한 OECD TG 439의 유사시험법평가기준을 토대로 2011~2012년에 검증연구를 수행하였다(8)(9).	(8)(9)(35)(36)(37) (38)(39)(40)

\* 초기의 ECVAM의 유사시험법평가기준은 유럽연합의 위험물질지침서(EU Dangerous Substances Directive)의 28번째 변경서에 기술된 분류체계를 위하여 개발된 EpiSkin™과 EpiDerm™SIT (EPI-200) 시험법을 평가한 검증연구(17)의 완료에 따라 2007년에 개발되었다. 2008년 GHS가 도입되었는데(1)(3) 이것은 비분류 물질과 분류물질을 구별하기 위해 *in vivo* 시험의 자극성 판정기준수치 2.0을 2.3으로 수정하여 판정기준 값을 효율적으로 전환하였다. 이러한 수정된 규정요구를 적용하기 위해, ECVAM 유사시험법평가기준의 정확성 수치와 참고시험물질 목록을 2009년 수정하였다(2)(8)(9). 초기의 유사시험법평가기준과 같이 수정된 유사시험법평가기준은 EpiSkin™과 EpiDerm™SIT (EPI-200)(17)의 자료를 기반으로 하였고, 추가적으로 SkinEthic™ RHE의 참고시험물질의 자료를 사용하였다. 시험법 EpiSkin™, EpiDerm™ SIT (EPI-200), SkinEthic™ RHE은 본 시험지침서를 정의하기 위해 사용되었다. 검증연구에 대한 자세한 정보는 본 OECD TG의 ECVAM(독일연방위해평가원) 배경문서에서 얻을 수 있다(24).

SIT: Skin Irritation Test

RHE: Reconstructed Human Epidermis



## 부록 II

### (본 시험지침서에 포함된 각 시험법에 대한 프로토콜 차이)

인체피부모델을 이용한 피부자극시험법은 그 프로토콜이 흡사하고 공통적으로 시험물질 처리 후 42시간을 배양한다(27)(28)(29). 다른 점은 각 시험법에 따른 다른 장벽기능에 관련된 주요 3가지 항목에 관한 것이고, 이는 다음과 같다.

- 가) 시험물질 처리 전 배양 시간과 배지의 양
- 나) 시험물질의 성상별 처리 방법
- 다) 시험물질 처리 후의 배지의 양

	EpiSkin™ (SM)	EpiDerm™ SIT(EPI-200)	SkinEthic RHE™	LabCyte EPI- MODEL24 SIT
<b>가) 전 배양(Pre-incubation)</b>				
배양시간	18-24 시간	18-24 시간	< 2 시간	15-30 시간
배지의 양	2 mL	0.9 mL	0.3 mL	0.5 mL
<b>나) 물질처리</b>				
액체	10 µL (26 µL/cm²)	30 µL (47 µL/cm²)	16 µL (32 µL/cm²)	25 µL (83 µL/cm²)
고체	10 mg (26 mg/cm²)+DW(5 µL)	25 mg (39 mg/cm²) +DPBS(25 µL)	16 mg (32mg/cm²) +DW(10 µL)	25 mg (83 mg/cm²) +DW(25 µL)
나일론 메시	사용하지 않음	필요한 경우	적용됨	사용하지 않음
총 적용시간	15분	60분	42분	15분
적용 온도	실온	① 실온에서 25분 ② 37°C에서 35분	실온	실온
<b>다) 후 배양 배지의 양(Post-incubation volume)</b>				
배지의 양	2mL	0.9mL×2	2mL	1mL
<b>라) 최대변동허용량</b>				
3개 조직 간 표준편차	SD≤18	SD≤18	SD≤18	SD≤18

DW : Distilled Water, 증류수

DPBS : Dulbecco's Phosphate Buffer Saline