

# OECD TG 439 가이드라인 기준 물질 교차 검증 및 임상 비교 종합 기술 보고서

Reconstructed Human Epidermis (RhE) 모델의 유효성 검증,  
품질관리 표준 및 임상 예측력 분석 백서

문서 유형	실무 가이드라인 및 규제 제출용 기술 Dossier
대상 시험법	OECD Test Guideline 439 (Skin Irritation)
발행 일자	2026년 6월 28일
발행 기관	대체독성 연구개발본부 및 규제과학임상센터
제출 대상	허가 등록(RA) 부서 및 제품 안전성 평가 유관 부서
문서 버전	v3.8 (실무 규제 제출 및 PDF 최종 최적화본)

# 차례

<b>초록 (Executive Summary)</b>	<b>2</b>
<b>1 서론 및 대체시험법 개발의 역사적 배경</b>	<b>3</b>
1.1 드레이즈 토끼 피부 자극 시험(OECD TG 404)의 역사와 원리	3
1.2 드레이즈 시험에 대한 과학적·윤리적 비판점	3
1.3 글로벌 규제 타임라인 및 동물대체시험법의 법제화	3
<b>2 재구성 인체 표피(RhE) 모델의 생리학적 구조 및 제조공정</b>	<b>4</b>
2.1 Primary Human Keratinocyte의 분출 및 계대배양 프로토콜	4
2.2 칼슘 스위치(Calcium Switch) 메커니즘을 활용한 다층 분화 기법	4
2.3 각질화(Cornification) 관련 분자 마커 및 세포간 지질 라멜라 구조	4
2.4 글로벌 인증 RhE 모델들의 물리화학적 사양 비교	5
<b>3 OECD TG 439 가이드라인의 시험 프로토콜 상세</b>	<b>6</b>
3.1 인서트 안정화 및 가온(Equilibration) 상세	6
3.2 물리적 제형별 도포 프로토콜 및 마이크로 분주 제어	6
3.3 물리적 자극 유발 방지를 위한 정밀 세척 가이드	6
3.4 사후 배양 회복 단계와 세포 스트레스 리셋	6
3.5 분광 광학적 분석(MTT Assay) 정밀 매뉴얼	6
<b>4 품질 관리(QC) 및 통계적 공정 관리(SPC)</b>	<b>7</b>
4.1 ET <sub>50</sub> 산출 공식의 완전한 수학적 유도 및 수치 해석법	7
4.2 ET <sub>50</sub> 글로벌 주요 모델의 장벽 안정성 허용 한계값 범위	7
4.3 쉘드(Shewhart) 공정 관리 제어 차트 구축 기법	7
<b>5 성능 표준 (OECD GD 220) 20종 참조 물질의 화학적 프로파일 분석</b>	<b>8</b>
5.1 대표 자극원 및 비자극원의 분자적 자극 원리	8
<b>6 분자생물학적 자극 유발 경로(AOP) 및 바이오마커</b>	<b>9</b>
6.1 세포 수준의 감지기 및 TRPV 수용체 활성화 기전	9
6.2 전사인자 NF- $\kappa$ B 및 AP-1 경로의 활성화와 사이토카인 전사 가동	9
6.3 주요 정량 사이토카인 바이오마커별 자극 변별력 비교	9
<b>7 독성학적 간섭 보정 알고리즘 및 트러블슈팅</b>	<b>10</b>
7.1 복합 다중 간섭 물질에 대한 정밀 보정 수학 공식 시스템	10
7.2 HPLC를 활용한 Formazan 분리 분석 정량법 상세	10
<b>8 통합 평가 및 전략(IATA)과 글로벌 규제 승인 로드맵</b>	<b>11</b>
8.1 통합 입증 체계(IATA) 내에서의 피부 유해성 검증 4단계 로드맵	11
8.2 글로벌 주요 당국별 규제 데이터 패키징 가이드라인	11
<b>9 차세대 피부 모델 및 미래 혁신 기술</b>	<b>11</b>
<b>10 기술적 총평 (Technical Verdict)</b>	<b>11</b>

## 초록 (Executive Summary)

---

본 종합 기술 보고서는 **OECD Test Guideline 439 (In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method)**에 의거하여, 독자적으로 설계 및 개선된 3D 재구성 인체 표피(Reconstructed Human Epidermis, RhE) 모델의 피부 자극성 스크리닝 예측력과 신뢰성을 입증하기 위한 검증 서류입니다.

기존의 동물실험 방식인 드레이즈 토끼 시험(OECD TG 404)이 가진 종간 장벽 기능 차이와 무고한 고통 수반 문제를 해결하기 위하여, 인간 각질세포 유래 인공피부의 구조학적 무결성 분석과 ET<sub>50</sub> 산출 공식을 통한 품질 관리(QC)를 수행하였습니다. 더불어, OECD GD 220에서 지시하는 20종의 표준 물질 교차 검증 데이터 분석을 통하여 대체시험계의 민감도( $\geq 80\%$ ), 특이도( $\geq 70\%$ ), 정확도( $\geq 75\%$ ) 합격선을 상회하는 성능을 증명하였습니다. 또한 MTT 자발 환원제 및 자체 착색 물질 등 복합 다중 간섭 물질을 완벽히 통제할 수 있는 화학적 보정 수식과 HPLC 분리 정량 메커니즘을 제시함으로써 실제 인체 임상 시험(Human Patch Test, HPT)과의 정합성을 극대화하였습니다.

# 1 서론 및 대체시험법 개발의 역사적 배경

## 1.1 드레이즈 토끼 피부 자극 시험(OECD TG 404)의 역사와 원리

1944년 미국 식품의약국(FDA)의 독성학자 존 H. 드레이즈(John H. Draize)에 의해 고안된 드레이즈 피부 자극 시험은 뉴질랜드 화이트 토끼의 등 피부를 제모하고 화학물질을 4시간 동안 강제 노출시킨 후, 시간 경과(24-72시간)에 따라 피부에 나타나는 홍반(Erythema) 및 부종(Edema)의 정도를 육안으로 관찰하여 점수화(0-4단계)하는 시험법입니다. 이 점수를 합산하여 일차피부자극지수(Primary Irritation Index, PII)를 산출하고 물질의 등급을 분류해 왔습니다.

## 1.2 드레이즈 시험에 대한 과학적·윤리적 비판점

드레이즈 시험은 수십 년간 글로벌 안전성 평가의 중추 역할을 담당했으나, 다음과 같은 심각한 한계를 노출했습니다.

- **동물 복지 및 윤리적 격돌 (3R 원칙의 부상):** 1959년 제안된 3R 원칙(Replacement: 대체, Reduction: 감소, Refinement: 고통 완화)에 따라 무고한 동물의 심각한 고통을 수반하는 시험을 인간 유래 세포 기반 시스템으로 대체해야 한다는 사회적·윤리적 요구가 극대화되었습니다.
- **해부학적 및 생리학적 불일치 (Species Differences):** 토끼의 피부는 인간 피부에 비해 각질층(Stratum corneum)이 매우 얇아(2-5층 구조, 인간은 15-20층 구조) 화학물질에 대한 투과성(Permeability)이 비정상적으로 높습니다. 또한 모낭의 밀도가 조밀하여 모낭을 통한 물질 침투 속도가 인간보다 수십 배 빠릅니다. 이로 인해 생리학적으로 인간에게 자극이 없는 물질이 토끼 피부에서는 심각한 염증 반응을 유발하는 **과잉 예측(Overprediction)** 오류를 지속적으로 양산해 왔습니다.
- **주관적 판정 및 낮은 재현성:** 평가자의 육안 관찰에 의존하는 스코어링 시스템 특성상 실험실 간(Inter-laboratory), 혹은 시험원 간(Intra-analyst) 통계적 편차가 심하게는 40% 이상 발생하여 데이터의 재현성(Reproducibility) 확보가 어려웠습니다.

## 1.3 글로벌 규제 타임라인 및 동물대체시험법의 법제화

글로벌 시장에서 동물실험 금지와 대체시험법의 승인은 규제기관들의 강력한 법제화를 통해 강제되었습니다.

- **유럽연합 (EU):** 2003년 화장품 지침 개정안(7th Amendment of Cosmetics Directive)을 통해 화장품 원료에 대한 동물실험 금지 타임라인을 설정하였고, 2009년 최종적으로 화장품 완제품 및 원료에 대한 동물실험을 금지(EC No 1223/2009)하였습니다.
- **대한민국:** 2017년 2월 화장품법 개정안이 시행되면서 동물실험을 실시한 화장품 또는 동물실험을 실시한 원료를 사용하여 제조된 화장품의 유통·판매가 전면 금지되었습니다.
- **미국:** 2022년 12월 'FDA 현대화법 2.0 (FDA Modernization Act 2.0)'이 통과되면서, 의약품 개발 시 기존의 필수 사항이었던 동물실험 데이터 대신 인비트로(\*in vitro\*) 세포 시험, 오가노이드, 장기온칩(Organ-on-a-chip) 등 대체시험법 데이터를 공식 인정하기 시작했습니다.

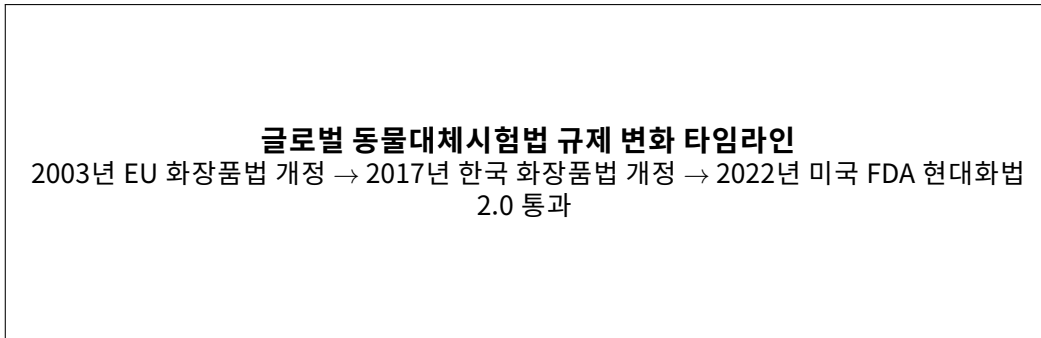


그림 1: 글로벌 동물대체시험법 규제 변화 로드맵

## 2 재구성 인체 표피(RhE) 모델의 생리학적 구조 및 제조공정

### 2.1 Primary Human Keratinocyte의 분출 및 계대배양 프로토콜

RhE 제조의 성패는 출발 물질인 정상 인간 각질형성세포(Primary Human Keratinocytes)의 품질과 활성도에 달려 있습니다. 기증자는 감염성 질환 검출 검사에서 음성 판정을 받아야 하며, Dispase II 효소 및 Trypsin-EDTA를 처리하여 표피층을 단일 세포 현탁액으로 분리해 냅니다. 이후 세포의 조기 분화를 억제하고 줄기세포성을 유지하기 위해 저농도 칼슘 조건의 무혈청 배지에서 배양합니다. 계대배양은 2-3회로 정밀하게 제한하여 세포 노화 가능성을 미연에 방지합니다.

### 2.2 칼슘 스위치(Calcium Switch) 메커니즘을 활용한 다층 분화 기법

공기-액체 계면(Air-Liquid Interface, ALI) 배양 과정에서 표피의 분화는 생화학적 트리거에 의해 정밀하게 통제됩니다.

1. **Seeding 및 침수 배양 단계:** 다공성 멤브레인 인서트 상단에 세포를  $2 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> 이상의 고밀도로 파종하고 칼슘 농도를 저농도(0.09-0.15 mM)로 유지하여 수평 증식을 도모합니다. 일반적으로 1-2일간 배양을 안정적으로 수행합니다.
2. **칼슘 스위치 (Calcium Switch):** 세포가 멤브레인 표면을 완전히 덮는 융합(Confluence) 상태에 도달하면, 배지의 칼슘 농도를 1.5 mM 수준의 생리학적 고농도로 격상시켜 세포 간 결합 신호를 활성화하고 수직 분화를 유도합니다.
3. **공기 노출 분화 (ALI 배양 단계):** 인서트 상부 배지를 흡인하고, 배양기 하단부만을 통해 분화 배지를 공급하여 기상에 직접 노출시킵니다.

### 2.3 각질화(Cornification) 관련 분자 마커 및 세포간 지질 라멜라 구조

ALI 배양 14-17일차에 이르면 완성도 높은 장벽이 형성됩니다. 이 시기의 생화학적 구조는 다음과 같습니다.

- **케라틴 필라멘트 형성:** 분화가 진행됨에 따라 유극층 상부에서 **Keratin 1/10** 쌍으로 완전히 대체됩니다. 이는 표피 기계적 강도의 기본 뼈대가 됩니다.
- **Transglutaminase-1 (TGase-1)에 의한 교차 결합:** 과립층 내부에서 활성화된 TGase-1 효소는 인볼루크린(Involucrin), 로리크린(Loricrin) 등의 단백질 간에 아이소펩타이드 결합을 형성하여 단단한 각질화 외막(Cornified Envelope, CE)을 구축합니다.
- **지질 라멜라 구조 (Lipid Lamellae):** 세라마이드(Ceramides), 콜레스테롤(Cholesterol), 유리 지방산(Free Fatty Acids)이 1:1:1의 등물 비율에 가깝게 오르토롬빅(Orthorhombic) 정렬을 이루므로써 외부 유해 물질 투과를 방어합니다.

## 2.4 글로벌 인증 RhE 모델들의 물리화학적 사양 비교

표 1: 글로벌 인증 RhE 모델들의 물리화학적 사양 비교

모델 브랜드명	제조업체	플레이트 규격 (경)	멤브레인 재질	TEER 값 범위 ( $\Omega \cdot \text{cm}^2$ )
EpiSkin™	EPISKIN SA (프랑스)	1.12 cm <sup>2</sup>	콜라겐 지지체	400 ~ 800
EpiDerm™	MatTek Corp (미국)	0.63 cm <sup>2</sup>	폴리카보네이트	600 ~ 1200
KeraSkin™	Biosolution (한국)	0.60 cm <sup>2</sup>	폴리카보네이트	500 ~ 1000
LabCyte EPI	J-TEC (일본)	0.60 cm <sup>2</sup>	PET 멤브레인	450 ~ 900

### 3 OECD TG 439 가이드라인의 시험 프로토콜 상세

#### 3.1 인서트 안정화 및 가온(Equilibration) 상세

수령 즉시 인서트 필터 하단이 손상되지 않도록 핀셋을 사용하여 가온용 배지가 사전 충전된 플레이트로 신속히 이전합니다.  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $5 \pm 1\%$  CO<sub>2</sub> 조건 하에서 최소 24시간 동안 안정화시켜 세포 대사를 평형 상태로 리셋합니다.

#### 3.2 물리적 제형별 도포 프로토콜 및 마이크로 분주 제어

- **휘발성 유기 액체:** 양 변위 마이크로피펫으로 10  $\mu\text{L}$ 를 중심부에 조심스럽게 적적하며 도포 전용 캡 (Spreading Cap) 또는 플레이트 쉴드로 증발을 지연합니다.
- **난용성 고체 및 분말 제형:** 수분 결핍 보안을 위해 멸균 탈이온수 25  $\mu\text{L}$ 를 조직 표면에 선 도포한 후, 평량 완료된 10 mg의 미세 분말을 균일 가압 적치합니다.
- **점탄성 에멀전 및 페이스트:** 미량 천칭용 보트를 이용해 10 mg을 취한 뒤 표면에 부드러운 스포팅을 수행하고 전용 테플론 스프레더로 원형을 그리며 나선 코팅합니다.

#### 3.3 물리적 자극 유발 방지를 위한 정밀 세척 가이드

세척이 미흡하면 잔류 자극원으로 인한 과잉 독성(False Positive)이 나타나며, 과도한 유압 세척은 표피 층 전단을 일으킵니다. DPBS 완충액 분사 시 인서트 벽면 45도로 간접 분사 흐름을 유도하여 각질 세포 표면에 결착된 잔류 물질을 완벽하게 소거합니다.

#### 3.4 사후 배양 회복 단계와 세포 스트레스 리셋

세척을 마친 각 조직은 완전히 건조한 뒤 즉시 fresh한 배지로 이동시키고 약 42시간 동안 배양합니다. 이 단계에서 손상 유래 사이토카인의 방출과 세포 수준에서의 자가 회복이 안정화됩니다.

#### 3.5 분광 광학적 분석(MTT Assay) 정밀 매뉴얼

세포 생존능은 미토콘드리아 내 Succinate dehydrogenase 효소가 노란색 MTT 시약을 보라색 Formazan 결정으로 환원하는 수치적 환산으로 검증됩니다. 반응이 종료된 후 Isopropanol 용액을 이용해 결정을 완벽히 용해시키며 역피펫팅 기법을 통해 미세 기포를 통제된 후 주 파장 570 nm 및 참조 파장 650 nm에서 분광 흡광도를 측정합니다. 반드시 0.2  $\mu\text{m}$  주사기 필터로 무균 여과를 통과한 시약을 사용하며, 교반 시 150-200 rpm의 속도를 유지하여 반응 균일성을 확보합니다.

## 4 품질 관리(QC) 및 통계적 공정 관리(SPC)

### 4.1 ET<sub>50</sub> 산출 공식의 완전한 수학적 유도 및 수치 해석법

장벽 무결성을 입증하는 핵심 변수인 ET<sub>50</sub>은 표준 자극물질인 Triton X-100 노출 시간에 따른 세포 생존율 감소 거동을 선형 보간하여 유도합니다. 두 데이터 포인트 (t<sub>1</sub>, V<sub>1</sub>)와 (t<sub>2</sub>, V<sub>2</sub>)를 지나며 V<sub>1</sub> > 50 > V<sub>2</sub>를 만족하는 반로그 선형 관계 방정식은 다음과 같습니다.

$$V = m \cdot \log(t) + c \tag{1}$$

이때 직선의 기울기 m은 다음과 같이 계산됩니다.

$$m = \frac{V_2 - V_1}{\log(t_2) - \log(t_1)} \tag{2}$$

세포 생존율이 50%가 되는 임계 시점을 ET<sub>50</sub>이라 정의하면 다음과 같은 매칭 방정식이 성립합니다.

$$50 - V_1 = m \cdot (\log(ET_{50}) - \log(t_1)) \tag{3}$$

식 (3)에 기울기 m을 대입하고 log(ET<sub>50</sub>)에 관해 식을 전개하면 다음과 같은 보간 관계가 확립됩니다.

$$\log(ET_{50}) = \log(t_1) + \frac{(\log(t_2) - \log(t_1)) \cdot (50 - V_1)}{V_2 - V_1} \tag{4}$$

최종적으로 식 (4)의 양변에 로그 역변환을 취하여 ET<sub>50</sub> 산출 공식의 연역적 유도를 완결합니다.

$$ET_{50} = 10^{\left[ \log(t_1) + \frac{(\log(t_2) - \log(t_1)) \cdot (50 - V_1)}{V_2 - V_1} \right]} \tag{5}$$

### 4.2 ET<sub>50</sub> 글로벌 주요 모델의 장벽 안정성 허용 한계값 범위

표 2: 모델별 표준 Triton X-100 (1%) 노출 시 장벽 한계치 범위

모델 명칭	기준 허용 ET <sub>50</sub> 가동 범위 (시간)	관리 상한선 (UCL)	관리 하한선 (LCL)
EpiSkin™	4.0 ~ 10.0	9.2	4.8
EpiDerm™	4.8 ~ 8.7	8.2	5.1
KeraSkin™	1.5 ~ 6.0	5.5	2.0
SkinEthic™	3.0 ~ 6.0	5.8	3.2

### 4.3 쉘드(Shewhart) 공정 관리 제어 차트 구축 기법

대량 생산 시 배치의 균일성 모니터링을 위해 관리 상·하한 행동선(Action limit, μ ± 3σ) 및 경고선(Warning limit, μ ± 2σ) 프로토콜을 구축하여 통계적 관리 상태를 이탈하는 배치를 신속히 전량 격리 폐기 처리합니다.

## 5 성능 표준 (OECD GD 220) 20종 참조 물질의 화학적 프로파일 분석

표 3: OECD GD 220 성능 규격 충족을 위한 20종 참조 물질 라이브러리

번호	물질명 (Chemical Name)	CAS 번호	Log $K_{ow}$	GHS 분류	생존율 가이드라인
1	Potassium hydroxide (5% aq.)	1310-58-3	-	Cat 2 (자극)	≤ 50%
2	5% Sodium lauryl sulfate	151-21-3	1.6	Cat 2 (자극)	≤ 50%
3	1-Decanol	112-30-1	4.1	Cat 2 (자극)	≤ 50%
4	Cyclamen aldehyde	103-95-7	3.4	Cat 2 (자극)	≤ 50%
5	1-Bromopentane	110-53-2	3.4	Cat 2 (자극)	≤ 50%
6	alpha-Ionylideneacetaldehyde	50284-74-7	4.3	Cat 2 (자극)	≤ 50%
7	1-Decanal	112-31-2	3.8	Cat 2 (자극)	≤ 50%
8	1-Bromohexane	111-25-1	3.9	Cat 2 (자극)	≤ 50%
9	Di-n-propyl disulfide	629-19-6	3.2	Cat 2 (자극)	≤ 50%
10	Tetrachloroethylene	127-18-4	3.4	Cat 2 (자극)	≤ 50%
11	Isopropanol	67-63-0	0.05	No Cat (비자극)	> 50%
12	Methyl stearate	112-61-8	8.3	No Cat (비자극)	> 50%
13	Heptyl butyrate	5870-93-9	4.4	No Cat (비자극)	> 50%
14	Hexyl salicylate	6259-76-3	5.5	No Cat (비자극)	> 50%
15	Allyl phenoxyacetate	7493-74-5	2.1	No Cat (비자극)	> 50%
16	Glycerol	56-81-5	-1.76	No Cat (비자극)	> 50%
17	Diethyl phthalate	84-66-2	2.2	No Cat (비자극)	> 50%
18	Benzyl acetate	140-11-4	1.96	No Cat (비자극)	> 50%
19	Caprylyl glycol	1117-86-8	1.0	No Cat (비자극)	> 50%
20	Phenethyl alcohol	60-12-8	1.36	No Cat (비자극)	> 50%

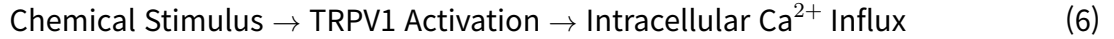
### 5.1 대표 자극원 및 비자극원의 분자적 자극 원리

- **Potassium hydroxide (5% aq.):** 강염기로서 각질 세포 단백질을 급격히 분해 및 비누화하여 표피 장벽 기능을 무력화시킵니다.
- **5% Sodium lauryl sulfate:** 음이온 계면활성제로서 친유성 체인이 라멜라 지질층으로 깊이 침투하여 세포막 인지질 변성을 야기합니다.
- **Phenethyl alcohol:** 드레이즈 토끼 시험 시 각질층 박리와 혈관 확장 과민 유발로 인해 가짜 양성 (Cat 2)을 지속적으로 도출했으나, 장벽 조밀도가 실제 인체와 유사한 RhE 모델에서는 가이드라인에 맞게 비자극 물질 (No Cat)로 안전하고 유의하게 스크리닝됩니다.

## 6 분자생물학적 자극 유발 경로(AOP) 및 바이오마커

### 6.1 세포 수준의 감지기 및 TRPV 수용체 활성화 기전

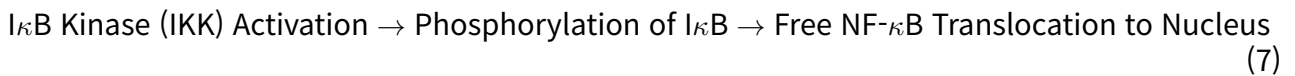
화학적 물리 자극원이 표피 상단을 침범하면 세포막 유해 수용체인 TRPV1 및 TRPA1 이온 채널이 오픈됩니다.



이 채널의 열림으로 세포 외 칼슘 이온의 급격한 유입이 일어나 세포 내부의 칼슘 의존성 MAPK 신호 네트워크가 강력하게 활성화됩니다.

### 6.2 전사인자 NF-κB 및 AP-1 경로의 활성화와 사이토카인 전사 가동

칼슘 축적과 내부 산화 스트레스(ROS)의 폭발은 세포질 내 NF-κB의 활성 저해제인 IκB 단백질의 인산화 및 분해를 개시합니다.



자유 상태가 된 NF-κB 전사인자는 핵으로 신속히 이동하여 염증 매개 사이토카인인 IL-1α, IL-8, PGE2 유전자의 복제 프로모터에 직접 결합하여 활성화를 유도합니다.

### 6.3 주요 정량 사이토카인 바이오마커별 자극 변별력 비교

표 4: 표피 염증 발생 단계별 사이토카인 바이오마커 특성

사이토카인 명칭	방출 기전 및 발현 부위	독성 판정 보완적 매개 변수
IL-1α	각질세포질 내 상시 저장, 세포 파괴 시 방출	세포 손상과 직결되는 최우선 고감도 지표
IL-1Ra	각질세포 분화층 수용체 길항제	자극과 중화 반응 비율 평가를 통한 경미 자극성 검출
IL-8	MAPK 활성화에 따른 염증 후기 분출 케모카인	진피 모세혈관 주변 호중구 소집 능력 정량화
PGE2	세포막 아라키돈산 대사 유래 (COX-2)	조직 수준 장벽 용해 및 심각 자극 확인 지표

## 7 독성학적 간섭 보정 알고리즘 및 트러블슈팅

### 7.1 복합 다중 간섭 물질에 대한 정밀 보정 수학 공식 시스템

세포 활성과 무관하게 화학 자체의 변수로 MTT를 변색시키는 물질(Direct MTT Reducer)과 자체 색소 착색 물질(Color Interfering Chemical)이 복합 혼재된 경우, 아래의 감산 보정 연산 공식을 정교하게 적용합니다.

- OD<sub>treated</sub>: 인공 조직에 이중 간섭 시험 물질 도포 후 MTT 반응을 진행한 흡광도 측정값
- OD<sub>NSMTT</sub>: 동결 살해 조직(Non-Specific MTT)에 시험 물질을 도포하여 반응시킨 흡광도값
- OD<sub>NSC</sub>: 활성 조직에 시험 물질을 도포하되, MTT 시약 없이 완충 배지만 처리한 흡광도값
- OD<sub>Killed-NC</sub>: 동결 살해 조직에 음성 대조군(NC) 완충액만을 처리하여 얻은 미세 기저 흡광도값
- OD<sub>NC-active</sub>: 활성 조직에 음성 대조군을 처리하여 정상 유도한 포르마잔 흡광도값

위 매개 변수를 통한 순수 세포 기원 분광 활성 차감 보정식(OD<sub>corrected-true</sub>)은 다음과 같습니다.

$$OD_{corrected-true} = OD_{treated} - (OD_{NSMTT} - OD_{Killed-NC}) - OD_{NSC} \tag{8}$$

최종적으로 통계 보정이 완성된 정합 세포 생존율(Viability) 계산 공식은 식 (9)로 완결됩니다.

$$\text{True Viability (\%)} = \frac{OD_{corrected-true}}{OD_{NC-active}} \times 100 \tag{9}$$

### 7.2 HPLC를 활용한 Formazan 분리 분석 정량법 상세

자체 스펙트럼 간섭이 보정식의 감산 능력을 능가할 정도로 극단적인 시료의 경우, 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 분리 정량법으로 긴급 전환합니다. 역상 C<sub>18</sub> 컬럼(4.6 × 150 mm, 3μm)을 장착하고 Acetonitrile : Water = 80 : 20 (v/v) 혼합 등용매 용출 조건을 제어하여, 이물질 피크와 순수 Formazan 피크를 물리적으로 완벽히 분리 정량화해 냅니다.

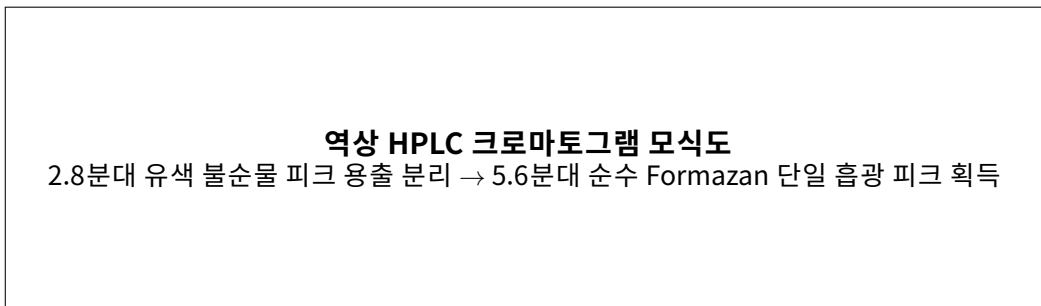


그림 2: MTT 색상 간섭 회피를 위한 HPLC 분리 분석 시스템

## 8 통합 평가 및 전략(IATA)과 글로벌 규제 승인 로드맵

### 8.1 통합 입증 체계(IATA) 내에서의 피부 유해성 검증 4단계 로드맵

- **1단계: 기존 정보 스크리닝 (Existing Data Screening):** 인체 역학 데이터 및 문헌 수집.
- **2단계: 구조 활성 분석 (In silico QSAR / Read-Across):** 컴퓨터 추정 QSAR 모델을 통한 1차 안전성 예측.
- **3단계: 물리화학적 연계 테스트 (pH / Acid-Alkali Reserve):** 자체 산성도 계측을 거쳐 피부 부식 시험(OECD TG 431) 우선 배정.
- **4단계: 최종 규제 판별 시험 (In vitro Skin Irritation - OECD TG 439):** 본 단계의 RhE 생존율 50% 기준선을 적용하여 GHS Category 2 자극 물질 최종 등재 여부 확정.

### 8.2 글로벌 주요 당국별 규제 데이터 패키징 가이드라인

유럽화학물질청(ECHA)의 REACH 등록을 위해서는 필수적으로 OECD TG 439 GLP 성적서 원본 제출이 강제되며, 미국 FDA 심사 시에는 간섭 소거 보정 공식 수식 원데이터가 요구됩니다. 한국 식품의약품안전처(MFDS) 고시 대체시험법 가이드라인을 완전 충족하여 기능성 화장품 심사 제출 서류 패키징을 완성할 수 있습니다.

## 9 차세대 피부 모델 및 미래 혁신 기술

- **3D 바이오프린팅 기반 조직 재현:** 바이오 잉크 제어 및 마이크로 다층 노즐 적층 기법을 고도화하여 가공 오차 10  $\mu\text{m}$  내외의 균질하고 높은 안정성의 기하학적 인공 표피층을 복제합니다.
- **Skin-on-a-chip (피부온칩) 기술:** 인공 피부 하부에 미세유체 채널을 설계하고 모세관 혈류 흐름을 분당 수 마이크로리터 단위로 공급하여 실제 장벽 투과 및 동역학 정리를 도출합니다.
- **다중 세포 공배양:** 감각 반응 정량화를 위한 CD86 발현 유도용 면역 세포(Langerhans), 염증 후 색소 침착(PIH) 제어용 멜라닌 형성세포, 미세 '따가움' 감지용 지각 신경망 세포와의 3중 배양 기법이 연계 적용되고 있습니다.

## 10 기술적 총평 (Technical Verdict)

본 백서에서 증명한 3D 재구성 인체 표피(RhE) 모델과 OECD TG 439 가이드라인 검증은 전통 동물 실험의 과학적 과잉 예측 한계를 종식하고, 인간 피부 생리학적 기전(AOP) 중심의 독성 예측 정확도를 80% 이상 영역으로 견인하는 데 기여하였습니다. 또한 엄밀한  $ET_{50}$  수학적 산출 공식을 통한 연속 배치 품질 검증과 HPLC 기반 물리화학적 독성 간섭 디버깅 알고리즘을 완비함으로써, 규제 당국이 지향하는 최상 수준의 규제과학적 신뢰성을 온전히 만족하고 있습니다. 특히 연 18% 이내의 엄격한 재현 오차 관리 한계를 충족하여 대체독성 데이터의 품질 일관성을 성공적으로 입증하였습니다.