

KeraSkin™과 제브라피쉬 배아를 이용한 동물대체시험법 시험의 비교 연구

유수진*, 이정훈**, 우지연*, 김선경*, 김민정**, 송주영***, 김동현*

*호서대학교 안전환경기술융합학과

**호서대학교 안전공학과

*** (주)에이치엔에이치 바이오

e-mail:ysz0218@naver.com

A Comparative Study of Alternative Animal Testing Methods Using KeraSkin™ and Zebrafish Embryos

Soo-Jin Yoo*, Jung-Hun Lee*, Ji-Yeon Woo*, Sun-Kyung Kim*, Min-Jung Kim**,
Ju-Young Song*, Dong-Hyun Kim*

*Dept. of Safety and Environmental Technology Convergence, Hoseo University

**Dept. of Safety Engineering, Hoseo University

***H&H bio

요약

본 논문에서는 *m*-Phenylenediamine을 동물대체시험법에 해당하는 KeraSkin™을 이용한 피부자극시험과 제브라피쉬 배아를 이용한 급성독성 시험법을 이용하여 독성을 평가하였다. *m*-Phenylenediamine은 염모제로 현재 판매는 가능하지만 제조가 금지되어 있어 시험물질로 선정하였다. KeraSkin™을 이용한 피부자극 시험과 제브라피쉬 배아를 이용한 시험을 같은 시험물질을 사용하여 OECD TG에 따라 실험을 진행하였으며, 시험결과와 가이드라인에는 명시되어 있지 않은 유의사항 및 실험방법을 비교하였다. KeraSkin™을 이용한 시험에서는 시험결과, 피부자극성이 있다고 판단되었으며, 제브라피쉬 배아를 이용한 실험에서는 ~mg/L에서 LC50을 산출하였다. 각 시험방법은 실험자의 주관적인 판단이 필요하거나, 수치적으로 객관적인 판단이 가능하다는 장·단점, 실험준비 기간을 포함한 경제적인 측면에서도 차이점을 기술하였다. 또한 동물을 사용한 시험과 비교하여 동물대체시험법의 지속적인 개발 필요성을 제시하였다.

1. 서론

안전성을 위한 동물실험은 그 타당성 여부에 대해 오랫동안 논란이 있었다. 동물과 인간은 메커니즘이 달라 반드시 인간에 미치는 영향을 완벽히 예측하는 것은 아니다. 동물 역시 생명이므로 동물실험은 인간의 안전성을 위해 희생되는 것이라 여겨 동물실험에 대한 부정적 인식이 존재하고 있다.

현재는 기술의 발달로 대체할 대안이 꾸준히 개발되고 있으며, 이에 따라 제도적으로 동물실험을 최소화하는 방향으로 나아가 동물대체시험법의 개발도 활발하게 이루어지고 있다. 최근 선진국을 중심으로 3R원칙에 따라 실험동물을 대체하거나 동물사용을 최소화하고, 고통을 감소시키는 방향으로의 동물대체시험법 개발 추진 및 시험동물 사용에 대한 규제가 강화되고 있다.

따라서 본 연구에서는 인체 피부세포에서 유래한 인공피부 모델 KeraSkin™을 이용한 피부자극시험과 제브라피쉬 배아를 이용한 독성시험을 OECD 평가기준에 따라 실시하여, 비교 분석하였다.

2. 실험 방법

2.1 시험물질

2023년 2월, 식품의약품안전처에서 *m*-Phenylenediamine을 포함한 염모제 성분 5종을 화장품에 사용할 수 없는 원료로 지정하였다. 위 성분들이 사람의 유전자에 손상이나 돌연변이를 일으킬 수 있는 유전독성을 가질 가능성을 배제할 수 없다는 평가에 의해 지정하였으며, 고시 개정일의 6개월 이후인 2023년 8월 22일부터 해당 성분이 포함된 제품은 제조·수입이 금지된 상태이다. 식품의약품안전처에서는 보존제, 염모제, 자외선 차단제 등에 들어가는 사용제한 원료 총 352개 성분을 5년 주기로 정기위해평가 등을 통해 안전성을 검토해왔다. 염모제의 경우, 유전독성 정보가 있거나, 해외에서 금지된 사례가 있는 성분부터 차례로 검토했다. 그러나, 이미 제조·수입한 제품은 고시 시행일로부터 2년간 판매할 수 있기 때문에 2025년 8월 21일까지 위 성분들이 포함된 제품을 판매할 수 있다.

따라서, 이미 유전독성이 있다고 검증되어 있지만, 시중에서

판매가 진행되고 있는 물질인 *m*-Phenylenedimine을 시험물질로 선정하였다.

2.2 KeraSkin™을 이용한 피부자극시험

KeraSkin™은 사람의 정상 피부각질세포를 분화시켜서 제조한 인공피부로 형질전환되지 않은 Stratum corneum, Granular, Spinous 그리고 basal 층 4개의 층 구조로 인체표피와 동일한 상피세포의 다층구조로 이루어져있다. 표피분화, 증식, 세포간결합 관련 표지자 발현이 되며, 필수 지질성분을 포함한 기능적 다층각질층을 형성하고 있다. 12 mm의 외부 직경세포로 공급이 되며, 바이러스 미생물에 대한 안전성이 확보되어있다. KeraSkin™은 국내 인체 조직 모델 연구 개발 기업인 바이오 솔루션이 개발하였다.

KeraSkin™을 이용한 피부자극시험은 본시험의 반응성이 확인됨에 따라 추가로 동결사멸 보정시험을 진행한다. 군구성은 시험물질 마다 3개의 인체피부모델을 사용하며, 본시험은 양성대조군과 음성대조군을 두고, 보정시험은 음성대조군만 포함한다. [표 1]은 본시험과 보정시험의 군 구성 처리량에 대해 설명하고 있다.

[표 1] KeraSkin™을 이용한 피부자극시험의 군 구성과 물질 처리량

시험종류	시험 군	반복	처리량
본시험	G1 음성대조군	1-3	40 µL
	G2 시험물질군	1-3	40 µL
	G3 양성대조군	1-3	40 µL
보정시험	G4 음성대조군	1-3	40 µL
	G5 시험물질군	1-3	40 µL

KeraSkin™을 입수 후, 인큐베이터에 안정화 시키고, 6 well plate로 옮겨 액체와 고체의 처리방법을 다르게 하여 물질처리를 진행했다. 물질처리 후, 인큐베이터에 적용시키고 세척과 후배양을 진행했다. MTT assay 단계에서는 배지를 제거한 후, MTT 용액을 내부에 처리했다. 그후, 차광상태로 인큐베이터에서 배양을 진행한 후, MTT 용액 등 이물질들을 제거하고 Isopropanol을 100 µL 씩 처리한 상태로 차광시켜 shaker에서 처리하여 Fomazan을 추출하였다. Fomazan 추출 후, Spectrophotometer(Molecular devices, U.S.A.)를 이용하여 570 nm 파장으로 흡광도를 측정하여 3개 well의 평균 값을 계산하여 최종 값으로 사용하였다. 보정시험은 입수 후 -80 °C에서 48 시간 이상 동결시켰다. 그 후 실험 방법은 본 시험과 동일하게 진행했다.

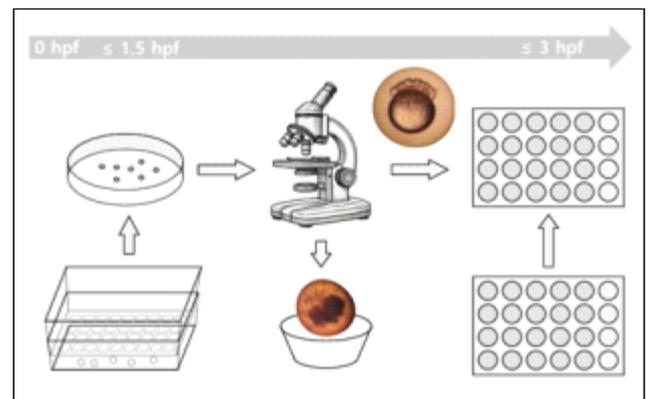
2.3 제브라피쉬 배아를 이용한 급성독성시험

제브라피쉬는 잉어과에 속하는 열대어류로, 푸른색 몸에 흰색 줄무늬를 가지고 있는 4-5 cm의 전장을 가지고 있는 어류다. 성체의 크기가 작고 큰 집단을 형성하고 있어, 사육이 쉬우며, 생애주기가 짧고 발달이 빨라 수정후 3-4개월이면 번식이 가능하다. 한 마리의 암컷이 일주일 간격으로 100개 이상의 알을 낳아 실험 대상 확보가 용이하며, 배아가 투명해 쉽게 발달 과정을 관찰할 수 있다. 또한, 중추신경계 뿐만 아니라 포유류와 유사한 신경전달 시스템을 가지고 있어, 물질이 신경계에 변화를 일으키는 기전을 확인하기에 용이하다.

시험방법은 제브라피쉬의 배아를 채란하여 난막손상이나 세포분열의 비대칭성과 같은 증상을 보이지 않는 수정란을 선별하여 실험에 사용했다. 인큐베이터를 이용하여 26±1 °C에서 배양하였으며, 예비시험을 거쳐 본시험의 농도를 결정하였다. [표 2]는 본시험의 군 구성과 시험물질 농도에 대해 설명하고 있으며, [그림 1]은 물질 처리 과정을 설명하고 있다.

[표 2] 제브라피쉬 배아를 이용한 급성독성시험의 군 구성과 물질 처리량

시험종류	군 구성	반복	농도
본시험	G1 음성대조군	1-3	1.75 mg/L
	G2 시험물질군	1-3	2.5 mg/L
	G3 양성대조군	1-3	5 mg/L
	G4 음성대조군	1-3	10 mg/L
	G5 시험물질군	1-3	20 mg/L



[그림 1] 제브라피쉬 배아를 이용한 급성독성시험 물질처리 과정

3. 실험결과 및 고찰

KeraSkin™을 이용한 피부자극 시험 결과, 흡광도 값을 이용하여 평균 세포생존율 산출한 값은 시험물질에서 11.13 %로 세포생존율이 50 %이하로 기록되었다. 보정시험에서 염색 비율이 5% 미만으로 기록되어 본시험 결과를 보정하지 않았으며, 음성대조군과 양성대조군 시험결과에 따른 시험 성립 조건을 만족하였다. 또한, 각 군 처리 조직 3개의 생존율 표준편차는 성립조건인 18% 이하를 만족하였다. 따라서 본 시험

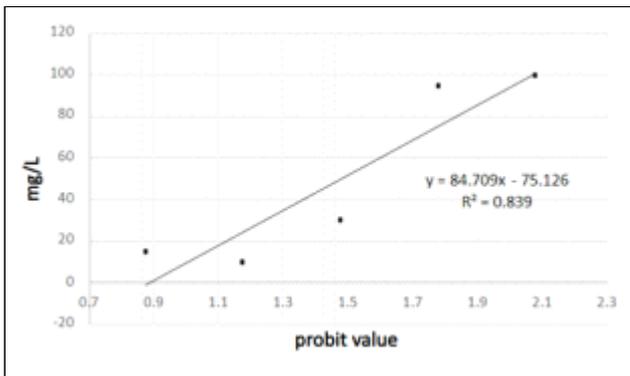
조건하에서 시험물질 *m*-Phenylenediamine은 <GHS category 분류기준>에 따라 ‘Category 2’인 자극성 물질로 분류되었다. [표 3]은 본시험의 OD값과 세포생존율을 설명한다.

[표 3] KeraSkin™을 이용한 피부자극시험의 본시험 OD값과 세포생존율

시험 군	반복	OD값	세포생존율(%)
D-PBS	1	1.148	103.33
	2	1.172	105.49
	3	1.013	91.18
	Mean	1.11	100
	S.D	0.07	6.30
<i>m</i> -PDA	1	0.119	10.74
	2	0.123	11.10
	3	0.128	11.55
	Mean	0.12	11.13
	S.D	0.00	0.33
5% SDS	1	0.018	1.65
	2	0.022	2.01
	3	0.022	2.01
	Mean	0.02	1.89
	S.D	0.00	0.17

제브라피쉬 배아를 이용한 급성독성 시험 결과로 반복 시험을 진행한 값을 통해 생존율을 계산하여 프로빗 계수로 환산하였다. 그 결과, LC₅₀은 0.51 mg/L 로 환산되었다.

채란한 모든 알의 수정률은 시험 배치에서 70 % 이상을 만족하였고, 음성대조군과 플레이트대조군에서 생존율이 모두 90 % 이상을 만족하였다. 또한, 양성대조군(4.0mg/L 3,4-DCA)에서 치사율은 30% 이상을 기록하여 시험의 성립 조건을 모두 만족하였다.



[그림 2] 제브라피쉬 배아를 이용한 급성독성시험 LC₅₀ 산출

4. 결론

피부자극성을 시험할 수 있는 실험동물과 인간의 중간 차이로 인하여 실험결과가 인간에게 모두 동일하게 적용되지 않을 수 있으며, 동물의 피부 자극정도를 측정하는 점수가 실험자의 주관적인 견해에 의해 평가되어야 한다. 또한, 실험동

물 별로 피부의 민감도 차이로 인해 실험결과와 변동성이 클 우려가 있다. 또한, 고통을 느끼는 동물을 이용하기 때문에 고통을 느끼는 생명체와 이에 따른 시험자 또한 스트레스를 많이 받게된다.

KeraSkin™을 이용한 피부자극 시험과 같은 in vitro 피부자극성 시험법은 시험물질을 인체피부모델에 적용한 다음 세포 생존율을 측정하여 자극성 유무를 판단한다. 이러한 시험법은 인간피부의 생화학적, 생리학적인 특성을 유사하게 나타낼 수 있고, 개체간 변동이 적다는 장점이 있다. 본 연구에서 최종세포생존율을 구하는 방법은 음성대조군의 흡광도값을 기준으로 시험물질의 흡광도값으로 산출하였다. 이러한 방법은 동물을 이용한 실험과는 다르게 시험자의 주관적인 판단이 따르지 않고 객관적인 수치에 따라 결과를 도출하는 것이 가능하다. 또한, KeraSkin™을 이용한 피부자극 시험은 우리나라에서 개발된 동물대체시험법으로써 국외 제품의 인공피부 이용법과 비교하였을 때, 인공피부의 수급과 이송시 조직의 환경변화에 따른 문제점을 최소화할 수 있다.

어류독성시험 중 동물실험에 해당하는 시험은 일반적으로 성체 또는 발달된 단계의 어류를 대상으로 하며, 이러한 실험의 대상이 되는 종은 고통을 느낄 수 있는 상태이다. 동물실험에서 동물의 정의는 특정 발달 단계에 있는 생명체만을 포함한다. 많은 국가의 동물보호법이나 관련 법규에서는 척추동물을 동물 실험의 대상으로 규정하지만 발생초기의 배아나 유생 단계의 동물은 성체로 간주하지 않는다. 성체 송사리, 잉어 등을 이용한 실험은 일반적인 동물실험으로 분류되며, 동물 대체실험법에 해당되지 않는다.

제브라피쉬 배아의 생명단계는 포유류의 태아 발달 초기 단계와 유사한 단계에 있어, 감각 기관이나 신경계가 완전히 형성되지 않은 상태다. 어류급성독성시험은 96시간 관찰기간 동안 실험을 진행하기 때문에 제브라피쉬 배아를 이용한 실험방법이 동물대체실험법의 기준에 적절하다. 또한, 제브라피쉬는 산란 수가 한 마리 당 200-300개이며, 메이팅케이지에서 산란을 준비시켰을 시 하루 뒤에는 채란이 가능하기 때문에 시험계의 수급이 원활하다는 장점이 있었다. 추가로, 실험진행 기간동안 제브라피쉬 배아는 먹이를 공급할 필요가 없기 때문에 먹이 투여 등으로 인한 사육환경 오염의 가능성을 원천차단할 수 있었다.

본 연구에서 진행한 실험인 KeraSkin™을 이용한 피부자극 시험과 제브라피쉬 배아를 이용한 급성독성시험을 비교한 결과는 다음과 같다. 시간적·경제적 면에서는 KeraSkin™을 이용한 피부자극 시험은 단점을 가지고 있다. 시험계의 이송시 온도유지로 인한 손상의 가능성과 높은 가격 때문에 재시험을 할 경우 매우 큰 경제적 손실을 가져올 수 있다. 반면에 제브라피쉬를 이용한 급성독성시험은 경제적 면에서 매우 좋은

시험방법에 해당된다. 제브라피쉬 성체의 수급도 매우 쉬웠으며, 메이팅 과정을 거치면 예상 시간에 채란작업을 진행할 수 있었다. 이러한 장점으로 실험 일정 설계가 매우 원활하였으며, 재시험에 대한 시간적, 경제적 우려가 없었다.

실험결과를 도출하는 방법을 비교하였을 때는 다음과 같다. KeraSkin™을 이용한 피부자극 시험은 흡광도값에 따라 결과를 산출하기 때문에 시험자의 주관적인 판단이 들어가 있지 않은 객관적이고 수치적인 결과를 도출할 수 있었다. 반면, 제브라피쉬 배아를 이용한 급성독성 시험에서는 4가지 종말점에 따른 관찰사항을 실험자가 판단해야하기 때문에 가이드라인에 따르더라도 실험자의 주관적인 판단이 개입될 수 밖에 없다. 또한, KeraSkin™은 일정한 조제 방법에 따라 모든 시험계가 같은 조건으로 제작되었지만, 제브라피쉬 배아는 직접 사육과 메이팅과정을 거쳐 채란을 통해 얻어지는 시험계이므로 유전적 편향성과 환경적인 변수가 개입될 수 있었다. 또한, 사육과정에서 여러 가지 변수와 지속적인 면에서는 꾸준한 관리가 필요했다. 이러한 면에서는 제브라피쉬 배아를 이용한 급성독성시험의 단점을 발견하였다.

참고문헌

- 학원, 2017. 서울
- [9] 정수민. "크기 특이적인 미세플라스틱의 제브라피쉬 신경 독성평가." 국내석사학위논문 서울과학기술대학교, 2021. 서울
- [1] 김다은. "다양한 통계적 접근을 통한 새로운 국소림프절 시험법의 예측력 평가 및 기존 시험법과의 비교." 국내석사학위논문 이화여자대학교 대학원, 2016. 서울
- [2] 최민지. "시판중인 인공피부모델을 이용한 피부자극 대체시험법의 비교검증연구." 국내석사학위논문 계명대학교, 2017. 대구
- [3] 이민영. "안자극 평가를 위한 동물시험법과 동물대체시험법의 경제성평가." 국내석사학위논문 이화여자대학교 대학원, 2016. 서울
- [4] 서승윤. "이미지 분석을 이용한 화학물질이 제브라피쉬의 움직임에 미치는 영향." 국내석사학위논문 홍익대학교 대학원, 2021. 서울
- [5] 김연숙. "인공피부모델 KeraSkin™을 이용한 피부자극 대체시험법의 실험실 내 적합성 검증 연구." 국내석사학위논문 계명대학교 일반대학원, 2012. 대구
- [6] 이현호. "제브라피쉬 배아모델에서 살생물질 CMIT/MIT의 시간차등 노출에 따른 발달독성 및 행동독성 연구." 국내석사학위논문 서울시립대 일반대학원, 2018. 서울
- [7] 오세훈. "조류를 이용한 금속계 제조나노물질의 생태독성 시험법 비교 연구." 국내석사학위논문 한양대학교 대학원, 2020. 서울
- [8] 한아람. "KeraSkin™-VM을 이용한 피부자극성 동물대체 시험법 검증연구." 국내석사학위논문 이화여자대학교 대