

제5장 건강영향 시험분야

제1항 급성 경피독성시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 경피로 단기간의 노출에 의해 일어날 가능성이 있는 건강장애에 관한 정보를 제공하며 아급성 및 기타 독성시험의 용량을 결정하고 또한 경피흡수 및 경피경로에 의한 독성작용기전에 대한 정보를 제공하는데 그 목적이 있다.

2. 정의

2.1 급성경피독성

시험물질을 피부에 1 회 도말하였을 때 짧은 시간내에 나타나는 악영향

2.2 용량 (Dose)

동물에 적용된 시험물질의 양. 일반적으로 단위는 시험동물의 체중당 시험물질의 무게 (예, mg/kg)로 표시

2.3 LD₅₀ (Median lethal dose)

경구로 1 회 투여시 시험동물의 50 %를 치사시킬 수 있는 시험물질의 용량

2.4 용량-반응 (Dose-reponse)

규정된 영향을 보이는 시험개체의 비율과 용량과의 관계

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1 예비사항

건강한 동물을 처리군에 무작위로 할당한 후 시험 전에 적어도 5 일간 시험용 케이지에서 사육하며 순화시킨다. 시험시작 약 24 시간 전에 시험동물의 구간배부의 피모를 면도기로 제거한다. 피부에 상처를 내면 투과성에 영향을 주므로 상처가 나지 않도록 주의한다. 적어도 체표면적의 10 %를 시험물질의 적용을 위하여 잘 제모하여야 한다. 제모할 범위 및 적용할 범위를 결정할 때 동물의 체중을 고려하여야 한다.

분말상태인 고체를 시험하고자 할 경우에는 시험물질을 피부와 잘 접촉시키기 위하여 물 또는 적당한 용매를 사용하여 충분히 습윤시켜야 한다. 용매를 사용할 경우 시험물질의 피부 투과성에 대한 용매의 영향에 대하여 고려해야 한다. 액상의 시험물질은 일반적으로 희석하지 않고 사용한다.

1.2 시험동물

1.2.1 동물종의 선택

성숙한 랫드, 토끼 또는 기니픽을 사용하고 다른 동물을 사용할 경우는 정당성을 제시해야한다. 시험을 용이하게 할 수 있는 동물의 체중범위는 다음과 같다.

랫드 200 g ~ 300 g, 토끼 2.0 kg ~ 3.0 kg, 기니픽 350 g ~ 450 g

1.2.2 동물수 및 성별

각 용량단계에서 상처가 없는 건강한 피부를 가진 암·수 동수의 동물이 필요하다. 각 용량단계에는 적어도 10 마리의 동물 (암컷 5 마리, 수컷 5 마리)을 사용하여야 한다. 암컷은 출산의 경험이 없거나 임신하지 않은 동물을 사용한다. 토끼의 경우 동물수를 적게 사용하는 것이 허용되나, 이는 LD₅₀의 측정에 방해요인으로 작용할 수 있다.

1.2.3 사육 및 급이조건

동물은 개별적으로 사육해야 한다. 시험동물실의 온도는 설치류의 경우 22 °C ± 3 °C, 토끼 20 °C ± 3 °C를 유지하고, 상대습도는 30 % ~ 70 %로 하여야 한다. 조명은 인위적으로 조정할 경우 매 12 시간 간격으로 점멸한다. 일반 실험

용 사료와 함께 음용수를 자유롭게 섭취시킨다.

1.3 시험조건

1.3.1 용량단계

3단계 이상의 용량을 설정해야하며, 시험군간에 일정한 독성효과와 사망률의 차이가 나타나도록 적절한 간격을 두어야 한다. 용량 단계 설정은 용량-반응곡선을 작성하는데 용이해야하며 적절한 LD₅₀가 산출될 수 있는 것이어야 한다.

1.3.2 한계시험

이 시험방법을 이용하여 2,000 mg/kg이상의 용량에서 시험물질로 인해 동물이 사망하지 않으면 3 가지 용량을 사용하는 본시험은 필요하지 않다. 그러나 시험물질과 관련된 사망이 관찰되었을 때는 본 시험을 수행해야 한다.

1.3.3 관찰기간

관찰은 적어도 14 일 동안 수행해야 하며 그것은 독성 반응이나 증상한 경우, 또는 회복기간을 고려하여 필요한 경우 관찰기간이 발생, 지속, 연장되어야 한다. 특히, 사망이 늦게 발생하는 경우 독성징후의 소실 시간, 그리고 사망시간을 관찰한다.

2. 시험방법

2.1 원리

여러 단계 용량의 시험물질을 1 군당 1 가지 용량을 시험동물의 피부에 적용한 후 독성 및 사망을 관찰한다. 시험기간 중 사망한 동물은 부검하고 시험의 종료시 생존한 동물도 도살하여 부검처리한다. 동물이 지속적으로 심한 고통의 징후를 나타내는 경우는 안락사를 시킬 필요가 있다. 시험물질이 부식성과 자극성을 나타내어 동물에 현저한 고통을 일으키는 경우에는 시험할 필요가 없다.

2.2 시험물질 투여

시험물질은 전체표면적의 약 10 % 범위에 해당하는 투여면적에 균일하게 적용한다. 독성이 강한 물질은 도포면적을 보다 적게 하는 경우도 있으나 도포부위

전체를 가능하면 얇고 균일한 필름상태로 넓게 피복해야 한다. 시험물질은 24 시간의 노출기간 중 다공성의 거즈, 비자극성 테이프를 사용하여 피부와 접촉을 유지시켜야만 한다.

시험적용 부위는 시험물질과 거즈 붕대를 유지시키기 위하여 적당한 방법으로 다시 덮어주어 동물이 시험물질을 섭취하지 못하도록 해야 한다. 시험물질의 섭취를 방지하기 위해 보조장비를 사용할 수 있으나 완전히 움직이지 못하게 하는 것은 권장하지 않는다. 노출 종료시에는 남아있는 시험물질은 물이나 적당한 용매를 사용하여 제거한다.

2.3 임상검사

관찰사항은 정확히 계통적으로 기록하며, 각 동물에 대한 기록을 남겨둔다. 시험물질을 투여한 후 첫날은 일정시간 간격으로 3 회 이상 관찰하고, 그 후에는 적어도 매일 1 회 주의 깊게 관찰해야 한다. 시험에서 동물의 손실을 최소화하기 위하여 매일 면밀하게 관찰을 해야 한다. 사망한 동물은 해부 및 냉장보존하고 쇠약 또는 빈사상태의 동물은 격리 또는 도살처분한다.

동물의 증상은 체모, 눈 및 점막, 호흡기계, 순환기계, 자율신경 및 중추신경계, 전신운동능력 및 행동패턴을 포함하여 관찰한다. 진전, 경련, 유연, 설사, 졸림, 수면 및 혼수에 대한 관찰은 특별한 주의를 기울여야한다. 사망한 시간은 가능한 한 정확히 기록해야 한다.

시험동물의 체중은 시험물질의 투여 직전, 투여 후에는 매주 및 사망시에 측정한다. 1 일 이상 생존하고 있는 동물의 체중 변화는 계산하여 기록해야 한다. 실험 종료 시에 생존동물은 체중측정을 한 후 부검한다.

2.4 병리검사

모든 동물은 부검을 실시해야 하며 육안으로 관찰되는 모든 병리 변화를 기록해야한다. 24 시간 또는 그 이상 생존한 동물에 있어서는 육안적 병리소견을 나타내는 기관의 현미경 검사를 실시한다.

2.5 암·수에 대한 독성평가

한쪽 성의 시험 종료 후 적어도 다른 쪽 성 1 군 5 마리에 투여하여 다른 쪽 성의 동물이 시험물질에 대하여 특별하게 현저히 높은 감수성을 갖고 있지 않음을 확인한다.

이때 상황에 따라 보다 적은 동물수를 사용할 수 있다. 한 쪽의 성이 시험물질에 보다 높은 감수성을 갖는지에 대한 충분한 정보가 얻어지는 경우에는 다른 쪽의 시험을 생략해도 된다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

결과는 표로 요약한다. 내용은 각 시험군마다 시험시작시의 동물수, 각 용량군의 개개 동물의 사망시간, 독성의 징후를 보이는 동물수, 독성 및 부검소견이다. 시험물질에 의한 고통과 괴로움을 이유로 동물을 안락사시킨 경우에는 시험물질에 의한 사망으로 기록한다.

LD₅₀의 결정은 일반적인 방법, 예를 들면, Bliss (1), Litchfield and Wilcoxon (2), Miller and Tainter (3), Weil (4) 등의 방법에 따라 구한다.

2. 시험결과의 보고

시험보고는 다음의 항목을 포함한다.

- 2.1 시험기관의 명칭 및 소재지
- 2.2 시험책임자 및 담당자 성명
- 2.3 사용된 동물종/계통/공급원의 환경조건
- 2.4 시험동물의 성별
- 2.5 용량군별의 반응성적표 (즉, 시험기간중에 사망 또는 도살된 동물수, 독성의징후를 나타낸 동물수, 노출된 동물수)
- 2.6 투여시간 및 투여후의 사망시간

2.7 지정된 측정방법으로 14 일째 산출한 동물성별에 대한 LD₅₀

2.8 LD₅₀의 95 % 신뢰한계

2.9 용량-사망을 곡선과 구배

2.10 병리소견

육안으로 해부소견이 관찰된 장기조직에 대하여 필요시 병리조직 검사

2.11 다른 성에 대해 실시된 시험이 있으면 그 결과

제2항 급성 흡입독성시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 흡입 가능한 물질(가스체, 휘발성 물질 또는 입자상물질)에 단기간 노출되었을 때 나타날 수 있는 건강장해를 평가하는데 그 목적이 있다. 이 시험 방법으로 얻은 결과는 시험 물질의 분류와 표시를 위한 기초자료로 이용될 수 있으며 아급성과 기타 독성시험에 대한 용량을 설정하는데 이용될 수 있다.

2. 용어정의

2.1 급성흡입독성

흡입 가능한 물질을 단기간(24 시간 이내)에 1 회 흡입 노출시켰을 때 시험물질에 의해 나타나는 악영향

2.2 LC₅₀

시험물질에 노출 후 일정시간 또는 노출 중에 시험동물의 반수를 사망시킬 수 있는 물질의 농도. 단위는 공기의 표준부피당 시험물질의 무게(mg/mL) 또는 ppm 으로 표시한다.

II. 시험

1. 원리

몇 개의 군으로 나눈 시험동물에 시험 물질을 단기간에 1 회 노출시킨 후 다양한 독성 영향, 반응 또는 사망 등에 대한 관찰을 하며, 시험 중에 사망한 동물은 부검하고 시험 종료 시까지 생존한 동물은 도살하여 부검한다. 극심한 통증 또는 지속적인 고통과 통증의 징후를 보이는 동물들에 대해서는 인도적으로 도살시키고 부검한다. 부식성 또는 자극성으로 인해 시험동물에게 고통을 유발시키는 것으로 알려진 시험물질은 본 시험을 수행하지 않는 것을 원칙으로 한다. 노

출환경 중에서의 적절한 농도를 유지하기 위하여 용매를 사용하는 경우에는 용매 노출균을 설정해야 한다.

2. 시험의 준비

2.1 예비사항

건강하게 성숙한 동물을 시험 전에 적어도 5 일간 시험환경에 순화시킨 후 시험 시작 전에 동물을 무작위로 그룹을 나눈다. 시험물질의 분산농도를 조정하기 위하여 필요한 경우 적당한 용매를 사용할 수 있다. 동물의 사용을 최소화하고 시험의 질적 수준을 향상시키기 위해서 시험물질에 대한 이용 가능한 모든 정보를 활용한다. 빈사상태의 동물이나 질병 및 고통이 지속되는 동물은 인도적으로 안락사 시킨다.

2.2 장치

19 %의 산소농도와 시험물질의 분산농도가 균일하게 유지되는 노출환경을 유지하는 것이 가능하고 시간당 12 회 ~ 15 회의 환기가 유지되도록 고안된 흡입장치(챔버)를 사용한다. 챔버 내를 약간 음압으로 유지시켜 시험물질이 누출되지 않도록 한다. 챔버를 사용하는 경우는 시험동물이 밀집하여 있는 상태를 최소한으로 하여, 시험물질의 노출이 최대로 유지되도록 한다. 챔버 내 환경의 안정성을 확실하게 유지하기 위해 사용동물의 총용적을 챔버 용적의 5 % 이내로 하는 것이 좋다. 다른 방법으로서 입, 피부노출, 두부노출, 전신개별챔버노출법 등을 사용할 수가 있다.

적절한 농도분석 및 조절 장치를 부착시킨 흡입장치를 사용하여야 한다. 장치 내 전체의 노출조건이 본질적으로 동일하게 유지되도록 공기의 유량을 조정해야 한다.

2.3 시험동물

(1) 동물종의 선택

건강하고 성숙한 동물을 사용하며 여러 종류의 포유동물을 사용할 수 있다. 바람직한 종은 랫드이며 일반적으로 실험실에서 사용되는 계통을 사용하도록 한다. 군분리 시 동물은 8 주령 ~ 12 주령의 동물을 사용한다. 시험에 사용하는 동물 개체 간 또는 군 간의 체중변동은 평균체중의 $\pm 20\%$ 를 초과하지 않아야 한다.

(2) 동물 수 및 성별

각 농도군에 적어도 10 마리(암컷 5 마리, 수컷 5 마리)를 사용한다. 암컷은 임신이나 출산의 경험이 없는 동물을 사용해야 한다.

(3) 사육 및 급이조건

시험동물실의 온도는 $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, 상대습도는 $30\% \sim 70\%$ 를 반드시 유지시킨다. 인공조명으로 할 경우 매 12 시간 간격으로 점멸한다. 사료는 일반적으로 널리 쓰이는 것을 사용하며, 음용수는 자유로이 섭취시킨다. 동물은 성별 군으로 사육해야 하며, 케이지 당 동물 수는 개개의 동물을 충분하게 관찰할 수 있는 범위로 한다.

각 동물에 고유한 식별 번호를 무작위로 부여한다. 시험물질의 생물학적특징이나 독성 영향(병적 상태, 민감성)에 따라서 개별적인 사육이 필요할 수 있다. 비부 노출은 동물의 체온과 분당 호흡량 등의 생리적인 한계점에 영향을 나타낼 수 있으므로, 비부로 노출시키는 동물은 순화기간 동안 노출홀더에 대한 적응훈련이 필요하다.

2.4 시험조건

(1) 노출농도

시험물질의 노출농도는 충분한 단계를 두도록 해야 하며 적어도 3 단계를 설정하여야 하는데, 시험군에서 독성작용이 나타나는 범위에서 농도-사망곡선이 그려지고 LC_{50} 의 산출이 가능하도록 설정하여야 한다. 시험물질이 폭발할 가능성이 있는 경우에는 폭발농도가 되지 않도록 주의한다. 적절한 노출농도를 설정하기 위하여 예비시험을 실시할 것을 권장한다.

(2) 한계시험

한계시험은 규제제한농도 이상에서 독성반응을 유발할 것으로 예측되는 시험물질에 대해서 수행한다. 한계시험은 일반적으로 암컷 및 수컷 각각 3 마리씩을 시험물질의 한계농도에 노출시킨다.

호흡 가능한 물질에 대해 가스는 실제 농도 20,000 ppm, 증기의 경우에는 20 mg/L, 에어로졸은 5 mg/L로 하고 4 시간 노출시킨다. 한계농도의 설정이 시험물질의 물리화학적 성상 때문에 불가능한 경우에는 시험이 가능한 최고농도로 설정하여 시험하고, 시험물질로 인한 사망이 발생하지 않을 경우에는 그 이상의 3 농도 단계를 사용하는 본시험을 할 필요는 없다.

(3) 노출시간

노출시간은 챔버 내의 농도가 평행을 이룬 후 적어도 4 시간 동안 수행한다. 비부 노출 시 랫드의 경우 6 시간, 마우스의 경우 4 시간을 초과시키지 않는다. 노출 시간의 연장이 필요한 경우, 이에 대한 판단 및 근거를 제시한 후 노출 시간을 변경한다.

(4) 관찰기간

관찰기간은 적어도 14 일간으로 하나 엄격히 규정된 것은 아니다. 관찰기간은 독성 반응과 증상출현율의 비율, 그리고 회복기간의 연장 등이 보일 때 결정되 필요에 따라 연장해도 좋다. 독성의 징후가 나타난 시간과 사망시간은 중요하며 특히 사망발현이 지연되어 일어나는 경향이 있는 경우에 중요하다.

3. 시험방법

3.1 시험물질 노출

노출직전에 시험동물의 체중을 측정하고, 지정한 장치에서 설정한 농도 및 기간 동안 노출시킨다. 흡입챔버내의 온도는 $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 로 유지해야 한다. 이상적인 상대습도는 30 % ~ 70 %로 하지만 이 조건을 실행할 수 없는 특별한 경우(시험물질의 물리화학적 특성 등에 따른 노출환경 및 측정방식의 특이성)에는 그 사유를 기술한다. 노출 중에는 먹이를 주지 않고 경우에 따라 음용수도 주지 않는다.

3.2 이화학적 측정항목

다음의 사항에 관하여 측정하거나 또는 모니터링을 실시한다.

(1) 공기의 유량

챔버에 흐르는 공기의 유량은 각각의 노출 시간 동안 최소한 한 시간 간격으로 연속적으로 측정하고 기록하여야 한다. 산소농도는 최소 19 % 이상을 유지시키고, 이산화탄소 농도는 1 %를 초과해서는 안 된다.

(2) 온도와 습도

노출 시간 동안 연속적인 측정 및 기록을 최소한 3 번 이상 수행하는 것이 바람직하다.

(3) 설정농도

설정농도(Nominal concentration)는 챔버에 발생된 시험물질의 총 질량을 챔버를 통과하는 공기의 총 부피로 나누어 계산하며 노출 후에는 농도를 계산하고 기록한다.

(4) 실측농도

시험물질의 실측농도(Actual concentration)는 동물의 호흡구역 내에서 측정되는 농도이며, 노출 시간 동안 각 시험의 실제 농도 측정 방법에 따라서 연속적으로 또는 주기적으로 측정되어야 한다. 노출중의 농도변동은 가능한 일정하게 해야 한다. 챔버에서의 노출되는 시험물질의 실제농도는 시험물질의 특성에 따라 중량측정법 또는 적절한 분석법을 이용한다.

(5) 입경분포

에어로졸의 입경분포는 노출 시간 동안 최소한 2 번 이상 캐스케이드 임팩터(Cascade impactor) 또는 이에 대한 대체 장비인 입자 계측기(Aerodynamic particle sizer) 등을 이용하여 측정한다. 증기 물질의 경우 응결되어 에어로졸화될 가능성이 있는 데 이 경우도 입경 분포를 측정하는 것이 바람직하다. 호흡기의 전체 각 부분에 노출이 잘 이루어지도록 하기 위해, 에어로졸 입자의 크기는 입자계측기로 입경평균 $1\ \mu\text{m} \sim 4\ \mu\text{m}$ 범위에서 1.5 ~ 3.0의 표준 편차 값을

나타내는 것이 바람직하다. 금속 흡은 이러한 기준치보다 낮을 가능성이 있고 대전 입자, 섬유, 흡습성 물질(기도의 습환경에서 입경이 증가) 등의 경우에는 이 기준치보다 높을 가능성이 있다.

3.3 관찰항목

노출기간동안과 노출 종료 후에 시험동물의 일반증상을 관찰하고 그 결과를 계통적으로 기록한다. 각각의 동물에 관하여 개별적으로 관찰하고 기록하여야 한다. 적어도 매일 1 회 이상 주의 깊게 시험물질에 의한 영향을 관찰하여야 한다. 노출 당일에는 가능한 2 번 이상 관찰한다. 시험동물의 손실을 최소화하기 위하여서는 매일 주의하여 관찰한다. 사망동물은 발견한 즉시 부검하거나 냉장보존하며, 쇠약해지거나 빈사상태의 동물은 격리하거나 도살 등 적절히 처치한다.

관찰항목은 특별히 제한을 두지는 않으나 피부, 피모, 눈, 점막, 호흡계, 순환계, 자율신경 및 중추신경계, 전신운동과 행동 패턴의 변화, 진전, 경련, 유연, 설사, 무기력, 수면 및 혼수, 사망 등을 포함한다. 사망시간은 가능한 한 정확히 기록해야 한다. 동물의 개별체중은 노출 후 매주 1 회와 사망 시에 측정하고 1 일 이상 생존한 경우에는 체중변화를 계산하고 기록해야 한다. 시험 종료 시 생존한 동물은 체중을 측정한 후 도살 처분한다.

3.4 체중측정

순화기간, 노출 전, 노출 후, 관찰기간, 도살 또는 안락사 시에는 개별동물의 체중을 측정하고 기록하여야 한다. 체중 변화는 독성 발현의 주요 인자이므로, 노출 전 측정한 체중 대비 20 % 이상의 체중 감소가 관찰된 동물의 경우 주의 깊게 관찰해야 한다.

3.5 병리검사

동물의 부검은 특히 기도에 어떠한 변화를 일으켰는지 특별한 주의를 해야 한다. 다른 장기가 관여하고 있을 가능성을 보여주는 독성징후가 있는 경우에는 이들의

장기도 조사하는 한편 모든 육안적 병리변화는 기록하여야 한다. 만약 계획도살 전에 사망한 동물이 발생되면 냉장상태로(냉동이 아닌)보관 한다. 이 때 부검은 가능한 하루나 이틀 이내로 바로 수행하여야 한다. 표적 기관의 현미경적 검사는 다양한 독성학적 정보를 제공하기 때문에 가능한 수행하는 것이 좋다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

시험결과는 각 군마다 시험 개시시의 동물 수, 개별동물의 사망시간, 독성징후를 나타낸 동물 수, 독성변화 및 부검소견을 표로 정리한다.

LC₅₀의 결정은 일반적으로 Bliss (1), Litchfield and Wilcoxon (2), Miller and Tainter (3), Weil (4) 등의 방법에 따라 구한다.

2. 시험결과의 보고

시험보고는 다음의 항목을 포함해야 한다.

2.1 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명

2.3 시험동물

- (1) 사육조건(케이지 당 동물 수, 깔짚, 온도, 상대습도, 광주기, 사료)
- (2) 랫드가 아닌 종을 사용할 경우 사용한 동물의 종/계통과 근거
- (3) 동물 수, 주령, 성별
- (4) 동물 군 분리시의 무작위 추출 방법
- (5) 사료와 음수에 대한 세부사항(사료의 유형/구입처, 음수의 구입처)
- (6) 시험 전 조건에 대한 설명(사료, 격리, 질병 치료)

2.4 시험물질

- (1) 물리적 기원, 순도, 이화학적 성질
- (2) 식별정보 및 CAS 번호

2.5 시험용매

- (1) 용매 사용과 선정의 근거
- (2) 용매가 연구 결과를 방해하지 않음을 입증하는 과거 혹은 현재의 자료

2.6 흡입챔버

- (1) 크기 및 부피를 포함하는 흡입챔버의 설명
- (2) 사용된 장치의 설명 및 구입처
- (3) 온도, 습도, 입자크기, 실측농도를 측정하기 위한 장치
- (4) 환경공기 조정의 방법
- (5) 배기의 처리
- (6) 압력차이(양압 혹은 음압)
- (7) 비부 노출 시 챔버 당 노출구, 전신 노출 시 시험계 안의 동물의 위치
- (8) 흡입장치의 공기 유량률(Air flow rates)
- (9) 산소, 이산화탄소 측정 장치
- (10) 흡입챔버가 평형에 도달하는 데 필요한 시간(t 95)
- (11) 시간 당 부피 변화 수
- (12) 계측 장비

2.7 노출자료

- (1) 목표 농도 선정 근거
- (2) 설정농도
- (3) 호흡구역에서의 실측농도
- (4) 공기 농도
- (5) 입자의 분포, 질량 중앙 공기역학적 직경

2.8 시험조건

- (1) 시험물질 준비의 세부사항
- (2) 시험 공기를 발생시키고 시험 공기에 동물을 노출시키기 위해 사용되는 장치에 대한 설명
- (3) 화학적 분석방법 및 검증
- (4) 시험농도 선정의 근거

2.9 시험결과

- (1) 챔버 온도, 습도, 공기 유량
- (2) 챔버의 설정농도, 실측농도 자료
- (3) 입자 크기 및 분포 자료
- (4) 성별 및 노출농도 군마다의 성적표
- (5) 시험동물의 체중변화
- (6) 관찰되었던 장애와 이상을 포함하는 부검 및 병리조직 소견
- (7) LC_{50} 95 % 신뢰한계
- (8) 통계학적 관계

2.10 시험결과에 대한 고찰 및 결론

제3항 피부 자극성 및 부식성 시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 화학물질을 실험동물의 피부에 도포한 후 발생하는 피부의 자극 정도를 평가하는 것을 목적으로 한다. 기존의 연구 결과, 구조적으로 피부 자극성과 관련이 있는 화학물질 또는 혼합물에 대한 자료, 화학물질의 강산 또는 강염기성, 검증된 생체의 시험(*In vitro* test) 결과를 바탕으로 화학물질의 피부 부식성/자극성을 평가한 후, 잠재성이 있다고 판단되는 경우, 본 시험을 수행할 것을 권고한다.

2. 정의

2.1. 피부자극

최대 4 시간 동안 시험 물질의 노출에 의해 발생하는 피부의 가역적인 손상

2.2. 피부부식

최대 4 시간 동안 시험 물질의 노출에 의해 표피 및 진피에서 괴사가 나타나는 피부의 비가역적인 손상. 궤양, 출혈, 유혈성 딱지(Bloody scab) 및 관찰 14 일에 걸쳐 나타나는 피부 표백, 탈모증, 흉터에 의한 탈색이 등이 포함됨

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1. 시험동물

1.1.1. 동물종의 선택

건강하고 어린 성체의 알비노 토끼를 사용하고, 다른 종을 사용하는 경우 정당한 사유를 제시해야 한다.

1.1.2. 동물의 준비

시험 24 시간 전, 동물의 등 부위의 털을 완전히 제거한 후 건강하고 피부가 손상되지 않은 동물만 사용한다.

1.1.3. 동물수 및 성별

초기 시험에서 1 마리의 동물(암컷 또는 수컷)을 사용하고 확인시험에서 2 마리를 추가로 사용한다.

1.1.4. 사육조건

시험동물실의 온도는 토끼의 경우 $20^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대습도는 50 % ~ 60 %가 최적이지만 30 % ~ 70 %도 가능하다. 12 시간의 주기로 인공 조명을 점멸한다. 통상적인 실험실용 사료를 사용하며, 음용수는 자유로이 섭취시킨다. 동물은 각 케이지에서 개별적으로 사육한다.

1.2. 시험물질

투여량은 액체의 경우 약 0.5 mL, 그리고 고체 또는 반고체의 경우 약 0.5 g으로 한다. 시험물질이 액체인 경우는 그대로 사용하며 고체 물질인 경우 피부에 잘 접촉될 수 있을 정도의 최소량의 물(또는 피부자극성이 없는 용매)에 시험물질에 용해시켜 적용한다.

2. 시험방법

2.1. 원리

시험물질을 단회로 실험동물의 피부에 적용하고, 시험물질을 바르지 않은 실험동물을 대조군으로 한다. 일정 시간 간격으로 자극/부식의 정도를 관찰한 후, 점수로 평가하고 세부사항을 기술한다.

2.2. 시험물질투여

시험물질을 시험동물의 피부(약 6 cm^2)에 적용 후 첩포로 덮고, 비자극성 테이프로 고정시킨다. 피부에 직접 바르기 불가능한 경우(액체 또는 반고체의 시험물질), 먼저 시험 물질을 거즈에 적용하고 피부에 붙인다. 노출 후에는 물 또는 적절한 용매를 사용하여 시험 물질을 제거한다.

2.2.1. 초기 시험(동물 1 마리로 실행하는 생체 내 피부 자극/부식 시험)

시험 물질이 피부를 부식시킬 것으로 의심되는 경우, 동물 1 마리로 초기시험을 실시한다. 만약 시험물질이 피부를 부식시킨다는 명확한 증거가 있는 경우, 동물 시험을 더 이상 진행하지 않는다.

3 개의 시험물질 첩포를 순차적으로 시험동물에 적용한다. 첫 번째 첩포 적용 3 분 후, 심각한 피부 반응이 관찰되지 않으면, 두 번째 첩포를 다른 부위에 적용, 1 시간 후 제거한다. 두 번째 노출 결과에서도 피부 반응이 관찰되지 않는다면 세 번째 첩포를 적용하고 4 시간 뒤 제거하고, 피부 반응 점수를 평가한다. 3 번의 순차적 노출 후, 피부 부식이 관찰되는 경우에는 시험을 종료하고, 피부부식이 관찰되지 않을 경우, 14 일 동안 시험동물을 관찰한다.

시험 물질이 피부부식성은 없지만 자극성이 있다고 판단되는 경우, 1 개의 시험물질 첩포를 4 시간 동안 시험동물에 적용하고 관찰한다.

2.2.2. 확인 시험(동물을 추가로 사용해 실행하는 생체 내 피부 자극 시험)

초기 시험에서 부식 효과가 관찰되지 않는 경우, 2 마리의 시험동물을 추가로 사용하여 확인시험을 실시한다. 각 동물에 시험물질 첩포 1 개를 4 시간 동안 노출시킨다. 초기 시험에서 피부자극성이 관찰된 경우, 2 마리의 시험동물에 순차적으로 시험 물질에 노출시켜 확인 시험을 실시한다. 이때 시험물질 첩포 1 개를 4 시간동안 노출한다.

2.3. 임상결과 및 피부반응 평가

임상증상 및 피부반응 평가표

홍반 및 가피 형성		부종형성	
반응	등급	반응	등급
홍반이 전혀 없음	0	부종이 전혀 없음	0
아주 가벼운 홍반 (육안으로 거의 식별할 정도)	1	아주 가벼운 부종 (육안으로 거의 식별할 정도)	1
명확한 홍반	2	가벼운 부종(뚜렷하게 부어올라서 노출부위가 구별될 정도)	2
중간정도부터 심한 홍반	3	중간정도의 부종(약 1 mm정도 부어올랐을 경우)	3
심한 홍반과 홍반을 평가할 수 없을 정도의 가피형성	4	심한 부종(1 mm 이상 부어오르고 노출부위 밖까지 확장된 경우)	4
최고점 : 4		최고점 : 4	

시험물질 노출 후 14 일 동안 시험동물을 관찰하고 14 일 전에 반응 가역성이 관찰되는 경우 시험을 종료한다. 홍반 및 부종의 징후를 평가하기 위해, 첩포를 제거한 뒤 1 시간, 24 시간, 48 시간, 72 시간 후, 피부에 나타나는 반응을 다음의 임상증상 및 피부반응 평가표에 따라 관찰한다. 초기시험의 경우, 첩포를 제거한 후, 시험 부위의 반응도 즉시 평가한다. 자극 반응을 평가하는 경우, 피부 손상의 가역성을 고려하여 탈모, 과각화증, 과형성증, 박피증이 14 일 동안 지속된다면 시험물질은 자극성이 있다고 판단한다. 피부반응을 판단하기 어려운 경우 조직병리학적 검사를 수행한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

도포 완료 후 1 시간, 24 시간, 48 시간, 그리고 72 시간 후에 관찰되는 홍반과 부종에 관한 등급을 임상증상 및 피부반응 평가표에 따라 표로 요약하여 나타낸다.

2. 시험결과의 보고

시험보고서는 다음의 항목을 표시한다.

2.1. 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2. 시험책임자 및 담당자 성명

2.3. 시험물질에 대한 기존 피부 자극/부식성 연구 결과

(1) 이전 시험으로부터 얻은 관련된 자료에 대한 설명

(2) 시험물질과 표준물질로부터 얻은 결과를 포함한 생체외(*In vitro*) 시험 결과

2.4. 시험물질

(1) CAS 번호, 공급처, 순도, 불순물, 제품 번호

(2) 물리적 특성 및 물리화학적 성상(즉, pH, 휘발성, 용해도, 안정도)

(3) 혼합물인 경우, 성분비 및 성분의 상대 비율

2.5. 사용용매

(1) 농도 및 부피

(2) 용매 선택에 대한 타당성

2.6. 실험동물

(1) 종/계통, 알비노 토끼 외의 동물을 사용하는 경우, 이유에 대한 설명

(2) 동물의 수

(3) 시험 시작시 및 종료시 각 동물의 체중

(4) 시험 시작시 동물의 연령

(5) 동물의 공급처, 사육 조건, 사료 등

2.7. 실험조건(도포방법, 도포후의 처치상황 등)

2.8. 결과

(1) 관찰된 각 동물의 자극/부식 반응 점수 표

(2) 관찰된 모든 손상에 대한 세부사항

(3) 관찰된 자극 혹은 부식 및 조직 병리학적 변화의 특성과 정도에 대한 세부사항

(4) 피부 자극 혹은 부식 외, 다른 국부 부위 및 조직에서 관찰된 반응

2.9. 결과에 대한 고찰 및 결론

제4항 눈 자극성 및 심한 눈 손상시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 화학물질이 안구나 점막에 노출되었을 때 나타나는 독성을 평가하는데 그 목적이 있다. 동물의 안구에 심각한 자극성이나 부식성이 있는 물질, 피부자극 시험결과 심한 피부자극이나 부식독성이 있는 물질은 본시험을 적용해서는 안된다.

2. 정의

2.1 안자극(Eye irritation)

시험물질이 눈에 노출되었을 경우 일어나는 안구의 가역적 변화

2.2 안부식(Eye corrosion)

시험물질이 눈에 노출되었을 경우 일어나는 안구의 비가역적 조직장해

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1 실험동물

실험시작 24 시간 전에 미리 안과학적 검사를 실시하여 안구손상이나 각막손상 등이 없는 건강한 개체를 사용한다.

1.1.1 종의 선택 : 주로 토끼 사용(2.0 kg ~ 3.0 kg)

1.1.2 동물의 수 : 우선 1 마리를 대상으로 실시하고 이상이 없는 경우 3 마리를 대상으로 실시한다.

1.1.3 실험동물의 사육관리 : 온도 20 °C ~ 22 °C(\pm 3 °C), 습도 30 % ~ 70 %, 조명 12 시간/12 시간(명암)주기

2. 시험방법

2.1 원리

시험물질을 건강한 동물의 한쪽 안구에 1 회 투여한 후 발생하는 독성을 관찰한다.

2.2 용량의 결정

2.2.1 액체인 경우 0.1 mL 고체, 반고체, 입자상태인 경우 100 mg이 넘지 않도록 한다.

2.2.2 분무상태의 물질인 경우는 눈에서 약 10 cm 거리에서 안구의 손상이 야기되지 않도록 주의하면서 1 초간 분무한다.

2.3 관찰기간

보통 21 일 이내로 한다.

2.4 실험의 절차

2.4.1 시험물질의 적용

시험물질을 한쪽 눈에 점안하고 나머지 한쪽과 비교한다.

2.4.2 국소마취제의 사용

2.4.3 시험물질의 세척

(1) 정상적인 경우 24 시간 동안 세척하지 않는다.

(2) 눈을 자극시키는 물질은 점안 20 초 ~ 30 초 후 양쪽 눈을 무균생리식염수로 세척한다.

2.4.4 관찰기간

점안 완료 후 1 시간, 24 시간, 48 시간, 72 시간

2.4.5 임상증상 및 안구반응 평가

임상증상과 다음에 명시된 표를 바탕으로 종합적 결론을 내린다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

결과는 표로 요약하며 각종 임상증상을 기록한다. 안구병변등급과 임상증상을 고려 종합적으로 평가한다 (별표).

2. 시험결과의 보고

결과보고서에는 다음의 사항을 기재한다.

- 2.1 시험기관의 명칭 및 소재지
- 2.2 시험책임자 및 담당자 성명
- 2.3 실험동물의 종 및 계통
- 2.4 시험물질의 물리화학적 성상
- 2.5 결과 요약 표 및 채점법의 간결한 기술
- 2.6 안구병변의 임상적 설명

각막	
A. 혼탁 : 안구의 농후한 정도(가장 농후한 지점을 관찰함)	
○화농이나 혼탁이 없음	0
○ 혼탁이나 분산 혹은 밀집되어 있음(정상적인 투명성이 약간 둔화된것과는 다름) 홍채의 말단이 명확히 관찰됨	1
○ 반투명한 부분이 쉽게 관찰됨, 홍채의 말단이 약간 불명확함	2
○ 진주색깔을 나타냄, 홍채의 말단이 관찰 안됨, 동공의 크기가 가까스로 관측됨	3
○ 각막이 불투명, 혼탁 때문에 홍채가 관찰 안됨	4
B. 혼탁된 각막의 범위	
○ 1/4 이하(그러나 0 은 아닌 경우)	1
○ 1/4 이상 1/2 미만	2
○ 1/2 이상 3/4미만	3
○ 3/4 이상 1 까지	4
$A \times B \times 5$ 최대치 50	
홍채	
A. 반응치	
○ 정상	0
○ 현저한 주름의 형성, 충혈, 종창, 각막 주위에 중등도의 충혈 이상과 같은 단독 혹은 혼합, 홍채는 빛에 대해 반응함(둔한 반응은 양성)	1
○ 빛에 대해 반응 없음, 출혈, 대부분 파괴(이상과 같은 증상의 일부 혹은 전부)	2
$A \times 5$ 최대치 = 10	
결막	
A. 발적(안검결막, 안구결막에 한함, 각막, 홍채 제외)	
○ 혈관은 정상	0
○ 몇몇 혈관은 명확히 충혈	1
○ 넓은 범위가 진홍색 색조(diffuse, crimson color), 각각의 혈관은 쉽게 관찰 안됨	2
○ 넓은 범위의 쇠고기색조의 붉은색(diffuse beefy red color)	3
B. 결막 부종	
○ 부풀지 않음	0
○ 정상보다 약간 종창(순막 포함)	1
○ 안검의 부분적 외전을 동반한 현저한 종창	2
○ 눈이 반쯤 감길 정도의 안검의 종창	3
○ 눈이 반이상 감길 정도의 안검의 종창	4
C. 배출물	
○ 배출물 없음	0
○ 약간의 배출물(정상동물의 내부 눈꼬리에서 관찰되는 작은 양 제외)	1
○ 속눈썹과 눈꺼풀을 적시는 배출물	2
○ 눈 주위의 상당 부위와 속눈썹과 눈꺼풀을 적시는 배출물	3
점수($A + B + C$) $\times 2$	

제5항 피부 과민성시험

I. 개요

1. 목적

이 시험의 목적은 시험물질이 알레르기를 유발하는 물질인지를 확인하기 위하여 선정된 방법에 따라 피부과민성을 조사하는데 있다.

2. 정의

2.1. 피부과민성

어떤 물질에 대해 면역학적으로 매개되어 나타나는 피부 반응

2.2. 유도노출

과민상태를 유발하기 위해 시험물질을 시험개체에 실험적으로 노출시키는 것

2.3. 유도기간

과민상태를 유발하는 유도노출 후 최소한 1 주일간의 기간

2.4. 유발노출

시험대상이 과민증을 보이는지의 여부를 판단하기 위해 유도기간 후 이전에 처리한 시험대상을 시험물질에 실험적으로 노출시키는 것

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1 시험동물

1.1.1 동물종 및 성

일반적으로 기니픽을 사용하도록 하며, 정당한 이유가 있을 경우에는 다른 동물을 이용해도 무관하다. 암컷은 임신하고 있지 않고, 출산 경험이 없는 것을 사용

한다.

1.1.2 연령

건강하고 젊은 성숙한 개체를 사용한다.

1.1.3 동물수

최소한 20 마리의 시험군과 10 마리의 대조군을 이용하여 실험한다.(재시험 시
최소한 10 마리의 시험군과 5 마리의 대조군을 이용하여 실험한다.)

2. 시험방법

2.1. GPMT(Guinea pig maximisation test)시험방법

2.1.1. 투여량

약한 피부 자극에서부터 중간 정도의 심각한 피부 자극을 일으키기 위해서, 각 유도
노출에 사용된 시험 물질을 체계적으로 잘 처리해, 최대 농도가 되도록 해야 한다. 유
발노출에 사용된 농도는 최대 비자극 투여량(Highest non-irritant dose)이어야 한다.
동물 2 마리 혹은 3 마리를 사용하는 예비시험(Pilot study)을 통해 적절한 농도를 결
정한다. 이런 목적을 위해 FCA(Freunds complete adjuvant)로 처리한 동물을 사용하
는 것을 고려해야 한다.

2.1.2. 유도 : 피내 주사

2.1.2.1. "0" 일 - 처리군

2.1.2.1.1. 피내 주사기 한 쌍이 정중선 양쪽에 놓이도록, 부피가 0.1 mL 인 피내 주
사기 세 쌍을 털을 제거한 어깨 부위에 놓는다.

2.1.2.1.1.1. 주사 #1 : FCA와 물(혹은 생리 식염수)의 비율이 1 : 1(v/v)인 혼
합물질

2.1.2.1.1.2. 주사 #2 : 일정한 농도로 적절한 용매에 함유된 시험물질

2.1.2.1.1.3. 주사 #3 : FCA와 물(혹은 생리 식염수) 비율이 1 : 1(v/v)인 혼합
물질에 일정한 농도로 함유된 시험물질

2.1.2.1.2. 주사 #3에서, FCA와 혼합하기 전, 수용성 물질을 수상으로 용해시킨
다. 수상과 혼합하기 전, 지용성 혹은 불용성 물질을 FCA로 현탁시킨다. 시험물

질의 농도는 주사 #2 의 농도와 같아야 한다.

2.1.2.1.3. 주사 #1과 주사 #2를 머리 근처에 서로 가깝게 놓고, 주사 #3은 시험 부위의 꼬리 부분을 향하게 놓는다.

2.1.2.2. "0" 일 - 대조군

피내 주사 세 쌍을 0.1 mL 의 부피로 처리군의 부위와 같은 부위에 놓는다.

2.1.2.2.1. 주사 #1 : FCA와 물(혹은 생리적 염류용액) 혼합물의 비율이 1 : 1(v/v)

2.1.2.2.2. 주사 #2 : 희석시키지 않은 매개물질

2.1.2.2.3. 주사기 #3 : FCA와 물(혹은 생리식염수) 혼합물의 비율을 1 : 1(v/v)로 배합시킨 50 %(w/v) 매개물질

2.1.3. 유도 : 국부 도포

2.1.3.1. "5 ~ 7" 일 - 처리군 및 대조군

시험 물질이 피부 자극이 없는 경우, 국소 자극을 유도하기 위해, 국소 유도 도포하기 약 24 시간 전 털을 자르거나 깎은 후, 10 % 소디움라우릴설페이트가 함유된 바셀린을 0.5 mL씩 도포한다.

2.1.3.2. "6 ~ 8" 일 - 처리군

시험 부위의 털을 다시 깨끗하게 제거한다. 적절한 매개물질을 사용해 여과지(2 cm × 4 cm)를 시험물질로 완전히 묻힌 후, 시험 부위에 도포한 다음, 폐쇄 드레싱을 사용해 48 시간 동안 고정시킨다. 매개물질 선택에 대한 정당성을 입증해야 한다. 매개물질이 고체인 경우, 곱게 갈아, 적절한 매개물질을 만든다. 매개물질이 액체인 경우(적절한 경우), 희석시키지 않고 그대로 도포할 수 있다.

2.1.3.3. "6 ~ 8" 일 - 대조군

시험 부위의 털을 다시 깨끗하게 제거한다. 유사한 방법으로 매개물질만 시험 부위에 도포한 다음, 폐쇄 드레싱을 사용해 48 시간 동안 고정시킨다.

2.1.4. 유발: 국부 도포

2.1.4.1. "20 ~ 22" 일 - 처리군 및 대조군

처리군 및 대조군 동물의 옆구리에 난 털을 제거한다. 시험 물질을 묻힌 첩포 혹은 챔

버를 동물의 한 쪽 옆구리에 붙인다. 관련 있는 경우, 매개물질을 묻힌 첩포 혹은 챔버 (Chamber)를 다른 쪽 옆구리에 붙인다. 폐쇄 드레싱을 사용해 24 시간 동안 첩포를 고정시킨다.

2.1.5. 관찰 - 처리군 및 대조군

2.1.5.1. 첩포를 제거한지 약 21 시간 후, 유발 노출 부위의 털을 제거한다. 필요한 경우, 깎거나, 밀거나, 탈모제를 사용해 털을 제거한다.

2.1.5.2. 약 3 시간 후(유발 첩포를 도포한지 약 48 시간 후), 피부 반응을 관찰한 후, 아래 주어진 점수에 따라 기록한다.

2.1.5.3. 관찰을 시작한지 약 24 시간 후, 두 번째 관찰(72 시간)을 한 다음, 다시 기록한다.

시험군 및 대조군 동물을 관찰할 때, 맹검법으로 관찰(Blind reading)하는 것이 장려된다.

표 : 유발 첩포 시험 반응 평가에 대한 Magnusson-kligman 점수 매기기

시험반응	점 수
변화 없음	0
분리된 혹은 고르지 못한 홍반	1
보통 및 융합성 홍반	2
심각한 홍반 및 팽창	3

2.1.6. 재유발(Rechallenge)

첫 번째 유발 노출로 얻은 결과를 입증해야 하는 경우, 첫 번째 유발 노출 뒤 약 1 주일 후, 새로운 대조군으로 두 번째 유발 노출(즉, 재유발)을 고려해야 한다. 기존의 대조군에 대해 재유발 노출을 실행할 수도 있다.

2.1.7. 임상 관찰

유도 및 유발 노출에 의해 발생하는 조직 계통의 반응을 포함한 모든 피부 반응과 모든 이상 증상을 관찰해 기록해야 한다. 의심스런 반응을 입증하기 위해, 다른 방법(즉, 조직 병리학 검사 및 피부 주름 두께 측정법)을 실행할 수도 있다.

2.2. Buehler시험방법

2.2.1. 투여량

2.2.1.1. 약한 자극을 일으키기 위해서, 각 유도 노출에 사용된 시험 물질의 농도를 최대 농도가 되도록 해야 한다. 유발 노출에 사용된 농도는 최대 비자극 투여량(Highest non-irritant dose)이어야 한다. 동물 2 마리 혹은 3 마리를 사용하는 준비 조사에 적절한 농도를 결정할 수 있다.

2.2.1.2. 수용성 시험 물질인 경우, 물 혹은 계면 활성제의 묽은 비자극성 용액을 매개물질로 사용하는 것이 적절하다. 다른 물질인 경우, 유도와 유발 노출에 대해, 각각 80 % 에탄올/물과 아세톤이 선호된다.

2.2.2. 유도 : 국부 도포

2.2.2.1. "0" 일 - 처리군

2.2.2.1.1. 한 쪽 옆구리에 난 털을 깨끗하게 깎아 제거한다. 적절한 매개물질(매개물질 선택에 대한 정당성을 입증해야 하며, 적절한 경우, 액체 시험 물질을 희석시키지 않고 그대로 도포 가능)을 사용해, 시험용 첩포를 시험 물질로 완전히 묻혀야 한다. 시험용 첩포를 시험 부위에 붙인 후, 폐쇄 첩포 혹은 챔버 및 적절한 드레싱을 사용해 6 시간 동안 피부에 고정시킨다.

2.2.2.1.2. 시험용 첩포 시스템은 반드시 폐쇄형이어야 한다. 면 패드는 적절한 것이어야 하고, 원형 혹은 정사각형을 사용한다. 폐쇄를 확실하게 하기 위해, 적절한 억제제를 사용하는 억제 시스템이 선호된다. 포장하는 경우, 추가 노출이 필요할 수 있다.

2.2.2.2. "0" 일 - 대조군

한 쪽 옆구리에 난 털을 깨끗하게 깎아 제거한다. 유사한 방법으로 매개물질만 대조군에 사용된 부위에 도포한다. 폐쇄 첩포 혹은 Chamber 및 적절한 드레싱을 사용해, 시험용 첩포를 6 시간 동안 피부에 고정시킨다. 허위 대조군이 반드시 필요 없다는 것을 설명할 수 있는 경우, Naive 대조군을 사용할 수 있다.

2.2.2.3. "6 ~ 8" 일 및 "13 ~ 15" 일 - 처리군 및 대조군

6 일 ~ 8 일에, "0" 일 방법과 똑같은 방법으로, 같은 옆구리의 같은 시험 부위(필요한

경우, 털 제거)에 도포한 후, 13 일 ~ 15 일에 다시 도포한다.

2.2.3. 유발

2.2.3.1. "27 ~ 29" 일 - 처리군 및 대조군

처리군 및 대조군의 처리하지 않은 옆구리에 난 털을 제거한다(깨끗하게 깎아서). 최대 비자극 농도에서, 적절한 양의 시험 물질이 함유된 폐쇄 첩포 혹은 Chamber를 처리군 및 대조군 동물의 처리하지 않은 뒤쪽 옆구리에 붙인다. 필요한 경우, 매개물질만 도포된 폐쇄 첩포 혹은 Chamber를 처리군 및 대조군 동물의 처리하지 않은 앞쪽 옆구리에 붙인다. 적절한 드레싱을 사용해, 첩포 혹은 Chamber를 6 시간 동안 고정시킨다.

2.2.4. 관찰 - 처리군 및 대조군

2.2.4.1. 첩포를 제거한지 약 21 시간 후, 유발 노출 부위의 털을 제거한다.

2.2.4.2. 약 3 시간 후(유발 첩포를 도포한지 약 30 시간 후), 피부 반응을 관찰한 후, GPMT에 주어진 점수에 따라 기록한다("2.1.5. 관찰 - 처리군 및 대조군" 참조).

2.2.4.3. 30 시간의 관찰 뒤 약 24 시간 후(유발 첩포를 도포한지 약 54 시간 후), 피부 반응을 다시 관찰한 후, 기록한다.

시험군 및 대조군 동물을 관찰할 때, 어렵하여 관찰하는 것이 장려된다.

2.2.5. 재유발

첫 번째 유발 노출로 얻은 결과를 입증해야 하는 경우, 첫 번째 유발 노출 뒤 약 1 주일 후, 새로운 대조군으로 두 번째 유발 노출(즉, 재유발)을 고려해야 한다. 기존의 대조군에 대해 재유발 노출을 실행할 수도 있다.

2.2.6. 임상 관찰

유도 및 유발 노출에 의해 발생하는 조직 계통의 반응을 포함한 모든 피부 반응과 모든 이상 증상을 관찰해 기록해야 한다. 의심스런 반응을 입증하기 위해, 다른 방법(즉, 조직 병리학 검사 및 피부 주름 두께 측정법)을 실행할 수도 있다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

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

2. 시험결과와 보고

시험의 보고에 다음과 같은 정보가 포함되어야 한다.

2.1. 시험물질

2.1.1. 물리·화학적 특성

2.1.2. 기존 연구 결과

2.2. 매개물질

매개물질 선택에 대한 정당성

2.3. 시험동물

2.3.1. 사용된 기니픽의 계통

2.3.2. 동물의 수, 나이 및 성별

2.3.3. 공급처, 사육 조건 등

2.3.4. 시험 시작시 및 종료시 각 동물의 몸무게

2.4. 시험조건

2.4.1. 첩포 부위 준비 방법

2.4.2. 사용된 첩포 물질과 첩포 방법에 대한 세부사항

2.4.3. 시험에 사용될 유도 및 유발 노출 농도와 준비 조사 결과

2.4.4. 시험 물질의 조제 방법, 도포, 제거에 대한 세부사항

2.4.5. 유도 및 유발 노출에 사용된 매개물질과 시험 물질의 농도, 유도 및 유발 노출에 사용된 시험 물질의 총량

2.5. 신뢰성 검사

사용된 시험 물질, 농도 및 매개물질에 관한 정보를 포함한 가장 최근 실행된 신뢰성 검사 결과의 요약

2.6. 결과

2.6.1. 점수 산출 시스템을 포함한 각 동물의 점수

2.6.2. 효과의 특성 및 정도에 대한 세부사항

2.6.3. 모든 조직 병리학 검사 결과

2.7. 결과의 토의

기니픽 시험을 실행하기 전 스크리닝 시험을 수행하는 경우, 시험 물질과 표준 물질로 얻은 결과와 함께, 시험 절차의 세부사항을 포함한 시험에 대한 설명 혹은 참고문헌을 제시해야한다.

제6항 28 일 반복 경구투여독성시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 설치류에 시험물질을 28 일 동안 반복 경구투여한 후 생체의 기능 및 형태의 변화를 관찰함으로써 시험물질의 독성을 평가하고, 아울러 90 일 반복 경구투여 독성시험 등 장기간의 반복투여 독성시험의 용량선택에 필요한 정보를 제공할 뿐만 아니라 잠재적인 내분비계장애물질을 선별하는 데 그 목적이 있다.

2. 용어 정의

2.1 용량 (Dose)

투여된 시험물질의 양. 일반적으로 단위는 시험동물의 단위무게 (체중) 당 시험물질의 무게 (예 mg/kg)로 표시

2.2 무악영향관찰용량 (NOAEL, No observed adverse effect level)

노출량-반응시험에서 노출집단과 적절한 무처리 집단간 악영향의 빈도나 심각성이 통계적으로 또는 생물학적으로 유의한 차이가 없는 노출량

2.3 위관투여법 (Gavage)

사료 또는 음용수를 통해 투여를 하지 않고 위장 튜브 또는 캐놀라를 이용한 강제적인 물질 투여방법

2.4 회복군 (Satellite group, Recovery group)

시험물질의 투여 종료 후 시험물질에 기인한 독성증상이 지연, 유지 또는 회복되는 지를 확인하기 위하여 필요시 추가하는 동물군

2.5 빈사상태 (Moribund status)

시험물질의 독성에 의하여 시험동물이 죽어가는 상태 또는 생존할 가망이 없는

상태

II. 시험

1. 원리

몇 가지 용량의 시험물질을 28 일 동안 여러 군의 동물에게 군당 1 개 용량으로 매일 경구 투여하고, 투여 기간 중 독성징후를 관찰하며 시험기간 중 죽은 동물 및 생존 동물을 부검하여 병리조직학적, 임상적 검사를 실시하여 독성을 평가한다.

2. 시험의 준비

2.1 시험동물

- (1) 시험동물로 선호되는 설치류 종은 랫드이며, 생후 9 주령 미만의 건강한 수컷 및 분만의 경험이 없거나 수태경험이 없는 암컷을 사용 한다. 만약 다른 설치류 종을 이용하는 경우에는 그 정당성을 상세하게 입증해야 한다. 본 시험이 향후 더 오랜 기간 동안 투여되는 장기간의 독성시험에 대한 예비시험으로 시행될 경우에는 두 시험 모두 동일한 계통 및 공급처의 동물을 이용한다.
- (2) 시험동물의 암수를 구별하여 케이지 당 5 마리 이하로 군별 사육한다. 시험 시 동물의 체중 변동이 적도록 하고 각 성별 평균 체중의 $\pm 20\%$ 를 초과하지 않도록 한다. 동물은 고유하게 식별해야 하고, 처치 시작 전에 최소 5 일 동안 케이지에서 적응하도록 한다.
- (3) 각 투여량 별 최소 10 마리(암수 각 5 마리 이상)를 사용 하며 대조군 및 시험군에 무작위로 할당한다. 중간에 안락사 시켜 검사를 하는 경우 거기에 필요한 수를 미리 추가한다. 투여 종료 후 최소 14 일 동안, 가역성, 지속성, 또는 독성 효과의 지연 발생을 관찰하기 위해 대조군 및 상위 용량 시험군에 추가적으로 10 마리씩(암수 각 5 마리)의 회복군을 설정할 수 있다.
- (4) 동물의 사용을 최소화하고 시험의 질적 수준을 향상시키기 위해서 시험물질에 대한 이용 가능한 모든 정보를 활용한다. 빈사상태의 동물이나 질병 또는 고통이 지속되는 동물은 인도적으로 안락사 시킨다.

2.2 사육 조건

사육실은 온도가 $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, 습도가 30 % ~ 70 %가 유지되도록 한다. 사육은 개별적으로 구별하거나, 소그룹 단위로 나누어 실시한다. 인공조명으로 매 12시간 간격으로 점멸한다. 사료는 일반적으로 널리 쓰는 것을 사용하며, 음용수는 자유로이 섭취시킨다. 사료의 오염 여부에 대해 정기적으로 분석하고, 보고가 끝날 때까지 사료 표본을 보유한다.

2.3 시험물질

시험물질은 적당한 용매에 용해 또는 현탁시킨다. 시험물질은 수용액/현탁액 사용이 우선적으로 권장되고, 오일이 함유된 용액/현탁액, 기타 용매 순으로 사용한다. 물 이외의 용매를 사용할 경우에는, 용매의 독성여부와 용매 내 시험물질의 안정성이 확인되어야 한다.

3. 시험방법

3.1 시험물질의 투여

- (1) 28 일 동안 매일 투여한다. 시험물질은 위관 투여법에 의해서나 사료 또는 음용수를 통해 투여된다. 위관 투여법은 매일 유사한 시간에 투여하도록 한다.
- (2) 경구투여 하는 시험물질의 양은 시험동물의 크기에 따라 다르나, 일반적으로 최대 1 mL/100 g(체중)을 넘지 않도록 한다. 다만 수용액의 경우는 2 mL/100 g(체중)까지 허용된다. 대조군에 속하는 동물은 시험물질을 제외하고는 시험군에 속하는 동물과 동일하게 취급하며 용매를 사용할 경우 대조군은 시험군에 사용된 용매의 최고 용적 단위로 투여한다.
- (3) 최소한 3 단계의 투여 용량의 시험군과 대조군을 이용한다. 기존의 독성시험자료를 검토한 결과 1,000 mg/kg(체중)/day(일)의 투여량에서 독성 영향이 없을 것으로 판단되면 한계시험을 수행하며, 적합한 자료가 없는 경우 용량설정시험을 (동일 계통 및 구입처의 동물) 수행함으로써 사용할 투여 용량을 결정할 수 있다.
- (4) 최고용량은 독성 효과 유도를 목표로 선택하고, 최저용량은 용량 관련 반응 및 악영향무관찰량을 입증하려는 목적으로 내림차순 순서로 선택 한다. 내림차순 순서는 2 배 ~ 4 배 간격이 최적인 경우가 많고 용량 간에 아주 큰 간격(예, 10 배 공비 이상)을 사용하기보다 4 번째 시험군을 추가하는 것이 더 좋다.

- (5) 시험물질을 사료와 섞어 투여할 경우에는 일정한 사료 농도(ppm) 또는 동물의 체중을 고려한 일정한 용량을 사용한다. 위관 투여법에 의해 투여된 물질은, 동물 체중을 고려한 일정 용량을 유지하기 위해 필요에 따라 조정한다.

3.2 한계시험

본 시험방법을 이용하여 1,000 mg/kg와 동등한 1 개 용량에서 독성이 관찰되지 않고, 시험물질과 구조적으로 유사한 화합물의 기존 정보를 통해 독성이 예상되지 않으면 3 단계 용량을 사용한 시험은 필요하지 않으며, 사람에게 노출 시 더 높은 투여량이 사용 될 필요가 있을 때 외에는 한계시험이 적용 될 수 있다.

3.3 관찰사항

- (1) 관찰기간은 28 일이다. 일반적인 임상관찰은 최소 1 일 1 회, 매일 같은 시간에, 투여 후 예상 영향이 최대로 나타나는 기간을 고려하여 시행되어야 한다. 관찰사항은 (주 1)에 표시하였다. 동물의 임상상태는 최소 1 일 2 회, 통상 매일 시작할 때와 끝날 때 이환율과 사망률의 징후에 대해 모든 동물을 관찰하고 기록한다.
- (2) 최초 노출 전에 1 회, 그리고 그 이후에는 매주 최소한 1 회, 모든 동물에 대해 상세한 임상 관찰을 실시해야 한다. 독성 효과의 사후 관찰이 예정된 회복군 내 동물은 투여 종료 후 최소한 14 일 동안 유지되어야 한다.
- (3) 투여 마지막 주에는 행동기능검사 (Functional observation battery, FOB)를 실시한다. 여러 가지 자극에 대한 감각반응검사, 양력검사, 운동성 검사가 포함되어야 한다.
- (4) 본 시험이 90 일 반복 경구투여시험에 대한 예비시험으로 시행되는 경우 또는 독성 징후가 드러나지 않는 경우 행동기능검사는 생략할 수 있다.
- (5) 모든 시험동물의 체중은 최소 주 1 회 측정한다. 사료 및 음용수 소비량은 최소 주 1 회 측정한다.

3.4 검사항목

3.4.1 혈액학 검사

시험 종료 시 동물을 안락사하기 직전 혈액을 채취하고 적절한 조건 하에서 보관한다. 혈액 표본 추출 전 하룻밤 동안 금식시키며 시험 기간 중 혈액샘플 채취 시

다음의 항목을 검사 한다. ; 적혈구용적률, 헤모글로빈 농도, 적혈구 수, 전체 및 분화 백혈구 수, 혈소판 수 및 혈액응고시간/잠재력 측정 단 시험물질 또는 대사 산물에 산화 특성이 있는 경우에는 메트 헤모글로빈 농도 및 하인츠 소체(Heinz bodies)가 반드시 포함되어야 한다.

3.4.2 생화학 검사

- (1) 모든 동물에서 채취한 혈액 표본에 대해 생화학적 검사를 시행한다.(주 2)
- (2) 일정시간마다 채취한 소변 및 시험기간 마지막 주중에 채취한 소변에 대해 다음과 같은 항목을 측정한다. ; 외관, 용적, 삼투압 또는 비중, pH, 단백질, 글루코오스 및 혈액/혈구
- (3) 시험물질이 대사 측면에 영향을 미칠 수 있으면 다음과 같은 항목을 포함 한다. ; 칼슘, 인산염, 트리글리세리드(Triglyceride), 특정 호르몬, 콜린에스테라아제 (Cholinesterase)
- (4) 시험물질의 뇌하수체-갑상선 축에 미치는 영향이 나타나면 T3, T4 및 TSH(선택 사항)을 측정한다. (주 3)

3.4.3 병리학 검사

- (1) 시험에 사용된 모든 동물은 전체 부검을 통하여 체표, 개구부, 두개, 흉강, 복강과 그 내용의 관찰을 포함한 육안적 검사를 실시한다. 모든 동물은 상세한 전체 부검을 실시하며 모든 병리 변화를 기록한다. (주 4) 조직병리학적 검사를 위해서 기관·조직을 적당한 보존액 중에 보존한다. (주 5)
- (2) 다음의 조직은 내분비 관련 효과에 대해 평가할 수 있는 징후를 제공할 수 있다. : 생식샘 (난소와 고환), 보조 성 기관(자궁 경관을 포함한 자궁, 부고환, 응고선을 포함한 정낭, 등 옆 부분 및 복부의 전립선), 질, 뇌하수체, 수컷 유선, 갑상선 및 부신
- (3) 선택사항으로 부검 시, 질도말표본 (Vaginal smears)을 제작하여 모든 암컷의 성 주기를 결정할 수 있다.
- (4) 모든 전체 병소를 검사해야 하며, 대조군 및 고용량 시험군에 속한 모든 동물의 보존된 기관 및 조직에 관해 완전한 조직병리학 검사를 수행한다. 고용량 시험군에서 변화가 관찰되면 이 검사는 모든 기타 용량군의 동물까지 연장한다. 보조군을 이용하는 경우, 시험군 내에서 영향이 나타나는 것으로 확인된 조직 및 기관에 대해서는 조직병리학을 수행한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

- (1) 개별 결과가 제공되어야 하며, 결과 값은 각 시험군 별로 다음의 항목을 표 형태로 요약한다.
- (2) 시험시작 시 동물의 수, 시험 중 사망했다고 판명되었거나 인도적 이유로 안락사한 동물의 수 및 안락사를 시킨 시간, 독성 징후를 나타낸 동물의 수와 시작시간, 지속기간, 독성 영향의 심각도를 포함한 독성 징후에 대한 설명, 병소를 나타내는 동물의 수와 병소의 유형, 각 병소 유형을 나타내는 동물의 백분율을 나타낸다.

2. 시험결과의 보고

시험보고서는 다음의 항목을 포함한다.

2.1 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명

2.3 시험물질 정보

- (1) 식별정보 및 CAS 등록번호
- (2) 물리적 성질과 순도
- (3) 이화학적 성질
- (4) 시험물질의 안정성
- (5) 시험물질의 용매 내에서의 용해도와 안정성

2.4 용매/보조제 종류 및 선정근거

2.5 시험 동물

- (1) 동물의 종/계통
- (2) 동물의 수, 주령, 성별
- (3) 구입처, 사육환경, 사료
- (4) 동물 식별 방법
- (5) 동물의 체중범위, 각 그룹별 평균 및 표준 편차를 포함하여, 시험 시작 및 종료 시 동물의 개별 중량
- (6) 랫드가 아니라면 사용한 종에 대한 근거 및 적정성

2.6 시험 조건

- (1) 투여 용량 선정에 대한 이론적 근거
- (2) 시험물질 제형/사료 준비내역, 달성된 농도, 안정성과 동질성(균질성)
- (3) 시험물질의 투여 내역에 대한 세부사항
- (4) 실제투여량 (mg/kg(체중)/일) 및 해당 시 사료/음용수 시험물질 농도(ppm)로부터 실제 투여량으로의 환산계수
- (5) 사료 및 음용수 품질에 관한 사항

2.7. 조사한 선택적 종단점 (주 6)

2.8 결과

- (1) 체중/체중 변화
- (2) 사료섭취량과 음용수섭취량
- (3) 독성 징후를 포함한 성별 및 용량별 독성 반응 자료
- (4) 시험 중 사망한 시간 또는 시험 종료 시 동물의 생존여부
- (5) 임상 관찰의 성격, 심각도와 지속기간(가역성 여부와 상관없이)
- (6) 감각적 활동, 그립강도악력 및 운동 활동 평가 (가능한 경우)
- (7) 관련 기준 값을 이용한 혈액학적 시험 결과
- (8) 관련 기준 값을 이용한 임상 생화학 시험 결과
- (9) 안락사 당시의 체중 및 기관 중량 측정 자료
- (10) 부검 조사결과
- (11) 모든 병리조직학적 조사결과에 대한 상세한 설명
- (12) 흡수량 자료(가능한 경우)
- (13) 결과의 적절한 통계적 처리

2.9 결론

주 1) 관찰사항

- (1) 일반 상태의 관찰사항 : 피부, 털, 눈, 점막 변화, 분비물과 배설물의 발생 및 자율신경 활동(예, 눈물 분비, 털 세움, 동공 크기, 다른 호흡 패턴), 간대성 또는 간질성 경련, 상동증(예, 과도한 털 손질, 반복적인 빙글빙글 돌기) 또는 기괴한 행동(예, 자해, 뒤로 걷기), 걸음걸이 변화, 자세 및 손을 댔을 때 반응의 변화
- (2) 네 번째 투여 주간 행동기능 관찰사항 : 상이한 유형의 자극에 대한 감각 반응도(예, 청각, 시각 및 자기수용성(Proprioceptive) 자극), 악력 강도, 운동 활동

주 2) 혈액 표본에 대한 생화학 측정 항목

- (1) 나트륨, 칼륨, 글루코오스, 총 콜레스테롤, 요소, 크레아티닌, 총 단백질 및 알부민
- (2) 간세포 영향을 나타내는 아래 효소 중 2 개 이상과 담즙산
(예) Alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase, γ -glutamyl trans-peptidase, sorbitol dehydrogenase
- (3) 특정 상황 하에서 추가 효소(간 또는 다른 데서 유래한) 및 빌리루빈
- (4) 시험물질이 대사에 영향을 미치는 경우 : 칼슘, 인산염, 트리글리세리드, 특정 호르몬, 콜린에스터라아제 (Cholinesterase)

주 3) 갑상선 활성 화학물질 평가를 위한 T3 및 T4 정량시 고려사항

- (1) 표본은 -20 °C에서 냉동상태로 보관한다.
- (2) 다음과 같은 요인을 고려한다.
 - ① 하루 동안의 호르몬 농도 변화 때문에, 안락사 되는 시각
 - ② 호르몬 농도에 영향을 미칠 수 있는 동물에 대한 부당한 스트레스를 피하기 위한 안락사 방법
 - ③ 표준 곡선 별로 상이할 수 있는 호르몬 측정용 시험 키트
- (3) 혈장 표본은 비슷한 시각에 획득되어야 한다.
- (4) 실험실내 균일한 데이터 확보를 위해 T3 및 T4에 대해서는 대조군 변동 계수를 25 미만으로, 또한 TSH에 대해서는 35 미만으로 유지한다.
- (5) 모든 농도는 ng/mL 단위로 기록한다.

주 4) 병리학적 검사를 위한 부검 항목

- (1) 모든 동물의 간, 신장, 부신, 고환, 부고환, 응고선을 포함한 전립선 + 정낭, 흉선, 비장, 뇌, 심장, 자궁 경관을 포함한 한 쌍의 난소는 부착 조직을 제거 후 건조를 피하기 위해 가능한 빨리 습중량을 측정한다.
- (2) 건조를 피하기 위해 해부 후 가능한 한 빨리 다른 조직 2 개의 무게를 선택적으로 달 수 있다 : (예) 자궁 경관을 포함한 한 쌍의 난소(습중량)와 자궁
- (3) 갑상선은 조직이 손상되면 병리조직학적 분석이 손상될 수 있으므로, 중량(선택 사항)은 고정 후에 측정될 수 있다.

주 5) 조직의 유형 및 후속 병리조직학적 검사를 위해 보존 항목

모든 전체 병소, 뇌(대뇌, 소뇌 및 뇌교를 포함한 부위), 척수, 눈, 위, 소장과 대장 (페이에르판(Peyer's patches) 포함), 간, 신장, 부신, 비장, 심장, 흉선, 갑상선, 기도, 폐 (고정액으로 팽창 시킨 후 보존), 생식샘 (고환과 난소), 보조 성기관 (자궁과 자궁 경관, 부고환, 응고선을 포함한 전립선 + 정낭), 질, 방광, 림프절 (근위의 배액림프절 와 다른 림프절), 말초 신경(좌골 또는 경골), 골격근및골수 (부분, 또는 대안으로서, 새로 고정시킨 골수 흡인물)가 포함된 뼈, 고환(매염제에 고정)

주 6) 내분비계장애물질 (EDs, Endocrine disrupters)을 검출하기 위해 권장되는 종말점

의무적 종말점	선택적 종말점
중량	
<ul style="list-style-type: none"> - 고환 - 부고환 - 부신 - 응고선을 포함한 전립선 + 정낭 	<ul style="list-style-type: none"> - 난소 - 자궁 경관을 포함한 자궁 - 갑상선
조직병리학	
<ul style="list-style-type: none"> - 생식샘: <ul style="list-style-type: none"> -고환 및 -난소 - 보조 성 기관: <ul style="list-style-type: none"> -부고환, -응고선을 포함한 전립선 + 정낭 -자궁 경관을 포함한 자궁 - 부신 - 갑상선 - 질 	<ul style="list-style-type: none"> - 질구 - 수컷 유선 - 뇌하수체
호르몬 측정	
	<ul style="list-style-type: none"> - T3, T4의 순환 수준 - TSH의 순환 수준

제7항 90 일 반복 경구투여독성시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 설치류에 시험물질을 90 일 동안 반복 경구투여하여 생체에 미치는 기능 및 형태 변화를 관찰함으로써 시험물질의 독성, 표적 기관 및 축적 가능성을 평가하고 아울러 만성독성시험 및 인체 노출에 대한 안전기준 설정에 필요한 투여용량 수준을 선택하고, 무악영향관찰량의 추정치를 제공하는 데 그 목적이 있다. 특히 신경독성, 면역 및 생식 기관에 영향을 미치는 화학물질을 선별하는데 필요한 근거를 제공한다.

2. 용어 정의

2.1 용량 (Dose)

투여된 시험물질의 양. 일반적으로 단위는 시험동물의 단위무게 (체중) 당 시험물질의 무게 (예 mg/kg)로 표시

2.2 무악영향관찰용량 (NOAEL, No observed adverse effect level)

노출량-반응시험에서 노출집단과 적절한 무처리 집단간 악영향의 빈도나 심각성이 통계적으로 또는 생물학적으로 유의한 차이가 없는 노출량

2.3 위관 투여법 (Gavage)

사료 또는 음용수를 통해 투여하지 않고 위장 튜브 또는 캐놀라를 이용한 강제적인 물질 투여방법

2.4 회복군 (Satellite group, Recovery group)

시험물질의 투여종료후 시험물질에 기인한 독성증상이 지연, 유지 또는 회복되는지 확인하기 위해 필요시 추가하는 동물군

2.5 빈사상태 (Moribund status)

시험물질의 독성에 의하여 시험동물이 죽어가는 상태 또는 생존할 가망이 없는 상태

II. 시험

1. 원리

몇 가지 용량의 시험물질을 90 일 동안 여러 군의 동물에게 군당 1 개 용량으로 매일 경구로 투여하고, 투여 기간 중 독성징후를 관찰하며 시험기간 중 죽은 동물 및 생존 동물을 부검하여 병리조직학적, 임상적 검사를 실시하여 독성을 평가한다.

2. 시험의 준비

2.1 시험동물

- (1) 시험동물로 선호되는 설치류 종은 랫드이며, 생후 9 주령 미만의 건강한 수컷 및 분만의 경험이 없거나 수태경험이 없는 암컷을 사용 한다. 마우스와 같은 다른 설치류도 사용될 수 있다. 본 시험이 향후 더 오랜 기간 동안 투여되는 장기간의 독성시험에 대한 예비시험으로 시행될 경우에는 두 시험 모두 동일한 계통 및 공급처의 동물을 이용한다.
- (2) 시험동물은 대조군과 시험군에 무작위로 할당되며 케이지 배치로 인한 영향이 최소화 되도록 한다. 시험 시 동물의 체중 변동이 적도록 하고 각 성별 평균 체중의 $\pm 20\%$ 를 초과하지 않도록 한다. 시험동물들은 최소 5 일 동안 실험실 조건에 적응하도록 한다. 동물에게 고유 식별 번호를 부여한다.
- (3) 각 투여 용량에서 최소 20 마리의 동물(암컷 10 마리, 수컷 10 마리)을 사용하며 중간에 안락사하여 검사를 하는 경우 거기에 필요한 수를 미리 추가한다. 회복군으로 화학물질의 노출 종료 후 독성 영향의 가역성이나 지속성을 관찰하기 위해 대조군 및 고용량 투여 그룹에 추가적으로 10 마리씩(암수 각 5 마리) 추가할 수 있다. 회복기간은 관찰되는 영향을 고려하여 적절하게 설정한다.
- (4) 동물의 사용을 최소화하고 시험의 질적 수준을 향상시키기 위해서 시험물질에 대한 이용 가능한 모든 정보를 활용한다. 빈사상태의 동물이나 질병 또는 고통이 지속되는 동물은 인도적으로 안락사 시킨다.

2.2 사육조건

사육실은 온도가 $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, 습도는 30 % ~ 70 %가 유지되도록 한다. 사육은 개별적으로 구별하거나, 소그룹 단위로 나누어 실시한다. 인공조명으로 매 12시간 간격으로 점멸한다. 사료는 일반적으로 넬리 쓰는 것을 사용하며, 음용수는 자유로이 섭취시킨다. 사료의 오염 여부에 대해 정기적으로 분석한다. 90 일 반복 경구투여독성시험이 만성 독성시험의 예비시험으로 이용될 경우, 두 시험에 유사한 사료를 사용한다.

2.3 시험물질

시험물질은 적당한 용매에 용해 또는 현탁시킨다. 시험물질은 수용액/현탁액 사용이 우선적으로 권장되고, 오일이 함유된 용약/현탁액, 기타 용매 순으로 사용한다. 물 이외의 용매를 사용할 경우에는 용매의 독성여부와 용매 내 시험물질의 안정성이 확인되어야 한다.

3. 시험방법

3.1 시험물질의 투여

- (1) 시험동물에게 90 일 동안 매주 7 일간 매일 투여한다. 주 5 일 투여와 같은 다른 투여 요법을 실시 할 때는 정당성이 입증 되어야 한다. 시험물질은 위관 투여법이나 사료나 음용수를 통해 투여되며 경구 투여방법은 시험물질의 특성 및 연구 목적에 따라 다르다.
- (2) 위관 투여법으로 투여 시 단일 용량 단위로 시행된다. 경구투여 하는 시험물질의 양은 시험동물의 크기에 따라 다르나, 일반적으로 최대 1 mL/100 g(체중)을 넘지 않도록 한다. 다만 수용액의 경우는 2 mL/100 g(체중)까지 허용한다. 매일 비슷한 시간에 투여하며, 동물의 체중을 고려한 일정 투여량 수준을 유지하기 위해 필요에 따라 조정 될 수 있다.
- (3) 최소 3 단계 투여량의 시험군과 대조군을 이용한다. (한계시험이 시행되는 경우 제외) 대조군은 미시험군이거나 용매-대조군이어야 하며, 시험물질을 처치하는 것 외에는 대조군에 속하는 동물은 시험군에 속하는 동물과 동일하게 취급되며, 용매를 사용할 경우 대조군은 시험군에 사용된 용매의 최고 용적 단위로 투여한다.

(4) 투여용량은 반복 투여량 또는 용량설정시험의 결과를 기준으로 할 수 있으며 기존의 독성학적 및 독성 동태학적 데이터를 고려한다. 최고 용량은 독성유도를 목표로 선택한다. 최소 용량에서 정량 관련 반응 및 무해용량을 입증하기 위해 투여량 수준은 2 배 ~ 4 배 간격의 내림차순으로 선택한다.

(5) 시험물질을 사료와 섞어 투여할 경우에는 시험물질이 섞인 사료의 섭취량이 줄어들면 사료의 섭취량을 고려한 짝-공급형(Pair-fed) 대조군을 둔다. 사료나 음용수로 투여 된 시험물질은 정상적인 영양 및 물의 체내 균형을 방해하지 않아야 하며 일정한 사료농도(ppm)나 동물의 체중을 고려한 일정 투여량이 사용 될 수 있다.

3.2 한계시험

본 시험방법을 이용하여 1,000 mg/kg와 동등한 1 개 용량에서 독성이 관찰되지 않고, 시험물질과 구조적으로 유사한 화합물의 기존 정보를 통해 독성이 예상되지 않으면 3 단계 용량을 사용한 시험은 필요하지 않으며, 사람에게 노출 시 더 높은 투여량이 사용 될 필요가 있을 때 외에는 한계시험이 적용 될 수 있다.

3.3 관찰사항

- (1) 관찰기간은 최소 90 일로 한다. 일반적인 임상관찰은 최소 1 일 1 회, 매일 같은 시간에, 투여 후 예상 영향이 최대로 나타나는 기간을 고려하여 시행되어야 한다. 동물의 임상상태는 최소 1 일 2 회, 통상 매일관찰하며 시작할 때와 끝날 때 이환율과 사망률의 징후에 대해 모든 동물을 관찰하고 기록한다. 모든 동물에 대한 상세한 임상관찰은 최초 노출 전 최소 1 회, 그 후 주 1 회 실시하여 기록한다. 관찰사항은 (주 1)에 표시하였다.
- (2) 명확히 규정된 채점 시스템을 이용하여 관찰하며, 관찰 조건의 변동이 최소가 되도록 한다.
- (3) 시험물질 투여 전과 시험종료 시, 검안경이나 적합한 장비를 이용해 고용량 투여군 및 대조군에 대해 반드시 안과학적 검사를 실시하며, 눈에서 변화가 검출되면 모든 동물에 대해 검사를 실시한다. 11 주차 이후에는 감각 반응도(청각, 시각 및 자기수용성 자극), 그립강도, 그리고 운동 활동에 대한 평가를 실시한다.
- (4) 모든 시험동물의 체중은 최소 주 1 회 측정한다. 사료 및 음용수 소비량은 최소

주 1 회 측정한다.

3.4 검사항목

3.4.1 혈액학 검사

시험 종료 시 동물을 안락사 시키기 직전에 혈액을 채취한다. 혈액 표본 추출 전 하룻밤 동안 금식시키며 시험 기간 중 혈액샘플 채취 시 다음의 항목을 검사 한다. ; 적혈구용적률, 헤모글로빈 농도, 적혈구 수, 전체 및 분화 백혈구 수, 혈소판 수 및 혈액응고시간/잠재력 측정

3.4.2 생화학 검사

- (1) 시험 종료 시 획득한 혈액 표본에 대한 생화학적 검사를 수행한다. (주 2)
- (2) 일정시간마다 채취한 소변 및 시험 마지막 주중에 채취한 소변에 대해 다음과 같은 항목을 측정한다. ; 외관, 용적, 삼투압 또는 비중, pH, 단백질, 글루코오스 및 혈액/혈구
- (3) 시험물질이 대사 측면에 영향을 미칠 수 있으면 다음과 같은 항목을 포함 한다. ; 칼슘, 인산염, 트리글리세리드(Triglyceride), 특정 호르몬, 콜린에스테라아제 (Cholinesterase)

3.4.3 병리학 검사

- (1) 시험에 사용된 모든 동물은 상세한 전체 부검을 실시하며 모든 병리학적 변화를 기록한다. 모든 동물의 간, 신장, 부신, 고환, 부고환, 자궁, 난소, 흉선, 비장, 뇌, 심장은 부착 조직을 제거 후 가능한 빨리 습중량을 측정한다. 빈사상태 또는 중간에 죽었다고 판명된 것은 제외한다. 조직병리학적 검사를 위해서 기관·조직을 적당한 보존액 중에 보존한다. (주 3)
- (2) 대조군 및 고용량 투여군의 모든 동물의 보존 된 기관 및 조직에 대해 완전한 조직병리학적 검사를 수행한다. 전체 병소를 검사한다. 고용량 투여군에서 시험 물질과 관련된 변화가 관찰되면 이 검사는 모든 군의 동물에 대해서도 실시되어야 한다. 회복군에서는 시험군에서 영향이 나타나는 조직 및 기관에 대해 조직병리학적 평가를 수행한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

- (1) 개별 결과가 제공되어야 하며, 데이터는 각 시험군 별로 다음의 항목을 표 형태로 요약한다.
- (2) 시험시작 시 동물의 수, 시험 중 사망했다고 판명되었거나 인도적 이유로 안락사한 동물의 수 및 안락사를 시킨 시간, 독성 징후를 나타낸 동물의 수와 시작시간, 지속기간, 독성 영향의 심각도를 포함한 독성 징후에 대한 설명, 병소를 나타내는 동물의 수와 병소의 유형, 각 병소 유형을 나타내는 동물의 백분율을 나타낸다.

2. 시험결과의 보고

시험보고서는 다음의 항목을 포함한다.

2.1 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명

2.3 시험물질 정보

- (1) 식별정보 및 CAS 등록번호
- (2) 물리적 성질과 순도
- (3) 이화학적 성질
- (4) 시험물질의 안정성
- (5) 시험물질의 용매 내에서의 용해도와 안정성

2.4 용매/보조제 종류 및 선정근거

2.5 시험 동물

- (1) 동물의 종/계통
- (2) 동물의 수, 주령, 성별
- (3) 구입처, 사육환경, 사료
- (4) 동물 식별 방법
- (5) 동물의 체중범위, 각 그룹별 평균 및 표준 편차를 포함하여, 시험 시작 및 종료 시 동물의 개별 중량
- (6) 랫드가 아니라면 사용한 종에 대한 근거 및 적정성 정당화

2.6 시험조건

- (1) 투여 용량 선정에 대한 이론적 근거

- (2) 시험물질 제형/사료 준비내역, 달성된 농도, 안정성과 동질성(균질성)
- (3) 시험물질의 투여 내역에 대한 세부사항
- (4) 실제투여량 (mg/kg(체중)/일) 및 해당 시 사료/음용수 시험물질 농 (ppm)로부터 실제 투여량으로의 환산계수
- (5) 사료 및 음용수 품질에 관한 사항

2.7 결과

- (1) 체중/체중 변화
- (2) 사료섭취량과 음용수 섭취량
- (3) 독성 징후를 포함한 성별 및 용량별 독성 반응 자료
- (4) 시험 중 사망한 시간 또는 시험 종료 시 동물의 생존여부
- (5) 임상 관찰의 성격, 심각도와 지속기간(가역성 여부 무관하게)
- (6) 안과학적 검사의 결과
- (7) 감각적 활동, 그립 강도 및 운동 활동 평가 (가능한 경우)
- (8) 관련 기준 값을 이용한 혈액학적 시험 결과
- (9) 관련 기준 값을 이용한 임상 생화학 시험 결과
- (10) 시험 말기 체중, 기관의 중량 및 기관/체중의 비율
- (11) 모든 병리 조직학적 조사결과에 대한 상세한 설명
- (12) 흡수량 자료 (가능한 경우)
- (13) 결과의 적절한 통계적 처리

2.8 결론

주 1) 관찰사항

- (1) 관찰시 목격된 징후
- (2) 피부, 털, 눈, 점막 변화, 분비물과 배설물 발생
- (3) 자율신경반응 (예, 눈물분비, 털 세움, 동공 크기, 이상한 호흡패턴)
- (4) 간헐적 경련성 및 강직성 안구 운동, 정형적인 거동 및 특이한 행동, 걸음걸이, 자세, 취급에 대한 반응

주 2) 혈액 표본에 대한 임상 생화학 측정 항목

- (1) 나트륨, 칼륨, 글루코오스, 총 콜레스테롤, 요소, 크레아티닌, 총 단백질 및 알부민
- (2) 간세포 영향을 나타내는 아래 효소 중 2 개 이상
(예) Alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase, γ -glutamyl trans-peptidase, sorbitol dehydrogenase
- (3) 특정 상황 하에서 추가 효소(간 또는 다른 데서 유래한) 및 담즙산
- (4) 일반조직손상

주 3) 조직의 유형 및 후속 병리조직학적 검사를 위해 보존할 필요가 있는 조직 목록
병소가 관찰된 조직, 뇌(대뇌, 소뇌 및 수질/뇌교를 포함한 대표부위), 척수 (경부, 중간 흉부, 요추), 뇌하수체, 갑상선, 부갑상선, 흉선, 식도, 침샘, 위, 큰 창자 (페이에르판(Peyer's patches) 포함), 작은 창자, 간, 췌장, 신장, 부신, 비장, 심장, 기도, 폐 (고정액으로 팽창 시킨 후 보존), 대동맥, 생식샘, 자궁, 보조 성 기관, 암컷의 유선, 전립선, 방광, 담낭(마우스), 림프절 (투여 경로 부근 및 투여 경로에서 멀리 위치한 것), 근육과 근접한 말초신경(좌골 또는 경골), 골수, 피부와 눈(안과학 검사 중에 변화가 관찰 되었을 시), 시험물질의 표적 기관의 가능성이 큰 기관

제8항 21 일/28 일 반복 경피투여독성시험

I. 개요

1. 목적

본 시험은 21 일 또는 28 일간 경피 반복투여를 통해 발생할 가능성이 있는 시험물질의 독성을 평가하는데 목적이 있다.

2. 용어 정의

2.1 용량 (Dose)

피부에 바른 시험물질의 양. 일반적으로 단위는 시험동물의 단위무게 (체중) 당 시험물질의 무게 (예 mg/kg)로 표시

2.2 무악영향관찰량 (NOAEL, No observed adverse effect level)

시험물질 투여로 인한 독성 반응이 관찰되지 않는 최고 투여 용량

2.3 회복군 (Satellite group, Recovery group)

시험물질의 투여 종료 후 시험물질에 기인한 독성증상이 지연, 유지 또는 회복되는 지를 확인하기 위하여 필요시 추가하는 동물군

2.4 빈사상태 (Moribund status)

시험물질의 독성에 의하여 시험동물이 죽어가는 상태 또는 생존할 가망이 없는 상태

II. 시험

1. 원리

몇 가지 용량의 시험물질을 여러 군의 동물에게 21 일/28 일 동안 군당 1 개 용량으로 매일 시험물질을 피부에 바르고, 바르는 기간 중 독성징후를 관찰하며 시험기간 중 사망한 동물과 끝까지 살아남은 동물을 부검하여 병리조직학적, 임상적 검사를 실시하여 독성을 평가한다.

2. 시험의 준비

2.1 시험동물

- (1) 성숙한 랫드, 토끼 또는 기니피그를 사용하고 다른 동물을 이용하는 경우에는 그 근거와 적정성이 제시되어야 한다. 건강한 수컷과 임신과 출산의 경험이 없는 암컷을 사용 한다. 시험을 시작할 때는 다음의 중량 범위를 권장 한다: 랫드 (200 g ~ 300 g), 토끼 (2.0 kg ~ 3.0 kg), 기니피그 (350 g ~ 450 g)
- (2) 각 투여량 별 상처가 없는 건강한 피부를 가진 최소 10 마리의 (암컷 5 마리, 수컷 5 마리)의 동물을 사용한다. 중간에 안락사 시켜 검사를 하는 경우 안락사에 필요한 수를 미리 추가한다. 동물을 시험 전 최소한 5 일 동안 실험실 조건에 순화시킨 후, 무작위로 시험군과 대조군으로 나눈다.
- (3) 시험시작 약 24 시간 전, 면도기 등으로 피부에 상처를 내지 않도록 시험동물의 피모를 제거한다. 체표면적의 최소 10 % 이상을 제모하며, 제모 범위 및 시험물질 적용 범위 결정 시 동물의 체중을 고려한다. 시험 시 반복적인 제모나 수염 깎기는 통상 주간 간격으로 실시한다.
- (4) 동물의 사용을 최소화하고 시험의 질적 수준을 향상시키기 위해서 시험물질에 대한 이용 가능한 모든 정보를 활용한다. 빈사상태의 동물이나 질병 및 고통이 지속되는 동물은 인도적으로 안락사 시킨다.

2.2 사육조건

동물은 개별적으로 케이지에 사육하며, 시험동물실의 온도는 설치류 22 °C(± 3 °C), 토끼 20 °C (± 3 °C)을 유지하고, 습도는 30 % ~ 70 %가 유지되도록 한다. 인공조명으로 매 12 시간 간격으로 점멸한다. 사료는 일반적으로 널리 쓰는 것을 사용하며, 음용수는 자유로이 섭취시킨다.

2.3 시험물질

분말상태의 고체를 시험 할 경우, 시험물질을 피부와 잘 접촉시키기 위해 물이나 적당한 용매를 이용해 충분히 습윤 시킬 수 있다. 용매를 사용할 경우 시험물질의 피부 투과성에 대한 용매의 영향을 고려하며, 액상 시험물질은 희석하지 않고 사용한다.

3. 시험방법

3.1 시험물질의 투여

- (1) 대조군 또는 용매 대조군을 설정하고, 최소 3 개의 용량의 시험군을 설정한다.
(주 1) 대조군에 속하는 동물을 시험군과 동일한 방법으로 처치한다.
- (2) 21 일 또는 28 일간의 반복투여독성시험의 투여기간을 제외하고 시험물질 투여 방법상의 차이는 없다. 투여기간 동안 매일 1 일 최소 6 시간 동안 각 시험군당 각각의 투여용량을 피부에 바른다. 주 7일 투여하는 것이 원칙이나 5 일간 적용하는 것이 허용될 수 있다.
- (3) 독성영향 및 지속성, 그로부터의 회복여부를 검사하기 위해 회복군 내 동물은 처치하지 않고 추가 14 일간 유지시킨다. 시험 중에 사망한 동물을 부검하며, 시험이 종결되면 살아남은 동물을 안락사 시키고 부검한다.
- (4) 시험물질은 전체표면적의 약 10 % 범위에 해당하는 투여면적에 균일하게 적용한다. 독성이 강한 물질은 도포면적을 보다 적게 하는 경우도 있으나, 도포부위 전체를 가능하면 얇고 균일한 필름상태로 넓게 피복해야 한다. 시험물질은 24 시간의 노출기간 중 다공성의 거즈, 비자극성 테이프를 사용하여 피부와 접촉을 유지시키며 동물이 시험물질을 섭취하지 못하게 하여야 한다.

3.2 한계시험

본 시험방법을 이용하여 1,000 mg/kg이상의 용량시험에서 시험물질로 인한 독성 영향이 없고 시험물질과 유사한 화학물질의 독성데이터를 참고할 때 본 시험물질의 독성이 예측되지 않으면, 3 개 용량을 사용한 본시험은 필요하지 않다.

3.3 관찰사항

- (1) 시험기간 동안 매일 1 회 이상 상세한 임상관찰을 한다. 독성영향의 시작시간, 정도 및 지속시간을 포함한 징후는 관찰 되는대로 정확히 기록한다. 동물의 증상은 피부, 체모, 눈 및 점막, 호흡기계, 순환기계, 자율신경 및 중추신경계, 전신운동능력 및 행동패턴을 포함하여 관찰한다. 동종포식, 조직의 자기분해, 잘못된 배치 등에 의해 동물이 손실되지 않도록 정기적으로 관찰한다.
- (2) 매 주 사료 소비량을 측정하고, 동물의 무게를 측정한다.
- (3) 시험이 끝난 후, 시험군 중 살아남은 모든 동물은 안락사 시키고, 빈사상태의 동

물이 관찰되면 안락사 시킨다.

3.4 검사항목

- (1) 모든 동물에 대해 생화학적 검사를 한다. (주 2) 소변검사는 일상적 기준으로는 필요하지 않으며, 신장 독성 등 주요 독성이 예측되거나 확인될 경우에는 소변검사를 실시한다.
- (2) 모든 동물은 전체 부검을 실시하며 전체 육안적 병리 변화를 기록한다. 간, 신장, 부신, 고환은 해부 후 신속히 습중량을 측정한다. 다음 기관과 조직은 향후 가능한 병리조직학적 검사를 위해 적정한 고정액에 보존한다.; 정상피부 및 처치된 피부, 간, 신장, 표적기관
- (3) 고용량 시험군과 대조군의 고정된 기관 및 조직에서 조직학적 검사를 실시한다. 필요 시 기타 시험군도 조직학적 검사를 실시할 수 있다. 회복군은 다른 시험군에서 영향이 나타난 기관과 조직에 대해 조직학적 검사를 실시한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

- (1) 결과는 표로 요약한다. 각 시험군 별로 시험시작 시 동물 수, 병소를 나타내는 동물의 수, 병소의 유형과 각 병소의 유형을 나타내는 동물의 백분율을 나타낸다. 관찰된 모든 결과는 적절한 통계적 방법으로 평가한다.
- (2) 결과는 시험물질의 투여량, 이상의 유무, 발생률과 심각도간의 관계 및 거동 및 임상이상, 전체 병소, 표적기관, 체중변화, 사망률에 미치는 영향 및 독성영향을 포함하도록 한다.

2. 시험결과의 보고

시험보고는 다음의 항목을 포함한다.

- 2.1 시험기관의 명칭 및 소재지
- 2.2 시험책임자 및 담당자 성명
- 2.3 시험물질 정보

- (1) 식별정보 및 CAS 번호
- (2) 물리적 성질과 순도

- (3) 이화학적 성질
- (4) 시험물질의 안정성
- (5) 시험물질의 용매 내에서의 용해도와 안정성

2.4 용매/보조제 종류 및 선정근거

2.5 시험 동물

- (1) 동물의 종/계통
- (2) 동물의 수, 주령, 성별
- (3) 구입처, 사육환경, 사료
- (4) 동물의 체중범위, 각 그룹별 평균 및 표준 편차를 포함하여, 시험을 시작 및 종료할 때 동물의 개별 중량

2.6 결과

- (1) 독성 및 기타영향
- (2) 성별 및 투여량 별 독성반응 결과
- (3) 시험 중 사망한 시간 또는 시험 종료 시 동물의 생존여부
- (4) 각 이상 징후 및 후속과정 관찰시간
- (5) 사료섭취량 및 체중 값
- (6) 혈액학 시험 결과
- (7) 생화학 시험 결과
- (8) 부검 조사결과
- (9) 모든 병리조직학적 조사결과에 대한 상세한 설명 및 통계적 처리

2.7 결론

주 1) 투여량 수준 설정 기준

- (1) 1 개 이상 중간 투여량 이용 시, 독성효과가 단계적으로 나타나도록 투여량 수준에는 적절한 간격을 둔다.
- (2) 최고 용량수준에서 독성 영향이 발생해야 하지만, 평가에 영향을 미칠만한 사망이 발생해서는 안 된다.
- (3) 고용량 단계에서 심각한 피부자극성이 발생하면 농도를 줄일 수 있다. 시험 초기에 피부가 심하게 손상되면 연구를 종료하고 저용량에서 새로운 연구를 수행할 필요가 있다.
- (4) 중간 용량은 최소한의 독성영향이 생기는 수준을 설정한다.

- (5) 최저 용량수준에서 독성이 발생하지 않고, 인체 노출에 대한 추정치를 이용할 수 있는 경우, 최저 용량수준은 이를 초과해야 한다.
- (6) 저용량과 중간용량 및 대조군에서는 유의한 결과를 도출하기 위해 사망 발생률이 낮아야한다.

주 2) 독성평가 항목

- (1) 혈액학적 평가 항목 : 적혈구용적률(Hematocrit), 헤모글로빈농도, 적혈구 수, 전체 및 분화 백혈구 수 및 응고시간, 프로트롬빈 시간, 트롬보플라스틴 시간
- (2) 임상 생화학 측정 항목 : 칼슘, 인, 염화물, 나트륨, 칼륨, 음식용 글루코오스(종에 적절한 음식 기간과 함께), 효소활성(Glutamic-pyruvic transaminase, glutamic oxalaocetic transaminase, ornithine decarboxylase, γ -glutamyl trans-peptidase), 요소 질소, 알부민, 혈액 크레아티닌, 총 빌리루빈 및 총 혈청 단백질량
- (3) 기타 독성학적 평가 항목 : 지질, 호르몬, 산/염기 균형, 메트헤모글로빈(Methemoglobin) 및 콜린에스터라아제 ((Cholinesterase) 활성 평가

제9항 90 일 반복 경피투여독성시험

I. 개요

1. 목적

본 시험은 90 일간 경피 반복 노출을 통해 발생할 가능성이 있는 시험물질의 독성을 평가하는데 목적이 있다.

2. 용어 정의

2.1 용량 (Dose)

피부에 바른 시험물질의 양. 일반적으로 단위는 시험동물의 단위무게 (체중) 당 시험물질의 무게 (예 mg/kg)로 표시

2.2 무악영향관찰용량 (NOAEL, No observed adverse effect level)

시험물질 투여로 인한 독성 반응이 관찰되지 않는 최고 투여 용량

2.3 회복군 (Satellite group, Recovery group)

시험물질의 투여 종료 후 시험물질에 기인한 독성증상이 지연, 유지 또는 회복되는 지를 확인하기 위하여 필요시 추가하는 동물군

2.4 빈사상태 (Moribund status)

시험물질의 독성에 의하여 시험동물이 죽어가는 상태 또는 생존할 가망이 없는 상태

II. 시험

1. 원리

몇 가지 용량의 시험물질을 여러 군의 동물에게 90 일 동안 군당 1 개 용량으로 매일 시험물질을 피부에 바르고, 바르는 기간 중 독성징후를 관찰하며 시험기간 중 죽은 동물과 끝까지 살아남은 동물을 부검하여 병리조직학적, 임상적 검사를 실시하여 독성을 평가한다.

2. 시험의 준비

2.1 시험동물

- (1) 성숙한 랫드, 토끼 또는 기니피그를 사용하고 다른 동물을 이용하는 경우에는 정당성이 상세하게 입증해야 한다. 건강한 수컷과 임신과 출산의 경험이 없는 암컷을 사용 한다. 시험을 시작할 때는 다음의 중량 범위를 권장 한다: 랫드 (200 g~300 g), 토끼 (2.0 kg ~ 3.0 kg), 기니피그 (350 g ~ 450 g)
- (2) 각 투여량 별 상처가 없는 건강한 피부를 가진 최소 20 마리의 (암컷 10 마리, 수컷 10 마리)의 동물을 사용한다. 중간에 안락사하여 검사를 하는 경우 시험을 진행할 때, 필요시 질병상태를 모니터링 하기 위해 추가하는 동물군에 필요한 수를 미리 추가한다. 동물을 시험 전 최소한 5 일 동안 실험실 조건에 익숙해지게 한 후, 무작위로 시험군과 대조군에 할당한다.
- (3) 시험시작 약 24 시간 전, 면도기 등으로 피부에 상처를 내지 않도록 시험동물의 피모를 제거한다. 체표면적의 최소 10 % 이상을 제모하며, 제모 범위 및 시험물질 적용 범위 결정 시 동물의 체중을 고려한다. 시험 시 반복적인 제모나 수염 깎기는 통상 주간 간격으로 실시한다.
- (4) 동물의 사용을 최소화하고 시험의 질적 수준을 향상시키기 위해서 시험물질에 대한 이용 가능한 모든 정보를 활용한다. 빈사상태의 동물이나 질병 및 고통이 지속되는 동물은 인도적으로 안락사 시킨다.

2.2 사육조건

동물은 개별적으로 케이지에 사육하며, 시험동물실의 온도는 설치류 $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, 토끼 $20^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 을 유지하고, 습도는 30 % ~ 70 %가 유지되도록 한다. 인공조명으로 매 12 시간 간격으로 점멸한다. 사료는 일반적으로 널리 쓰는 것을 사용하며, 음용수는 자유로이 섭취시킨다.

2.3 시험물질

분말상태의 고체를 시험 할 경우, 시험물질을 피부와 잘 접촉시키기 위해 물이나 적당한 용매를 이용해 충분히 습윤 시킬 수 있다. 용매를 사용할 경우 시험물질의 피부 투과성에 대한 용매의 영향을 고려하며, 액상 시험물질은 희석하지 않고 사

용한다.

3. 시험방법

3.1 시험물질의 투여

- (1) 대조군 또는 용매 대조군을 설정하고, 최소 3 개의 용량의 시험군을 시험한다.
(주 1) 대조군에 속하는 동물을 시험군과 동일한 방법으로 처치한다.
- (2) 투여 동안 매일 1 일 최소 6 시간 동안 각 시험군당 각각의 용량을 피부에 바른다. 주 7일 투여하는 것이 원칙이나 5 일간 적용하는 것이 허용될 수 있다.
- (3) 독성영향 및 지속성, 그로부터의 회복여부를 검사하기 위해 회복군 내 동물은 처치하지 않고 추가 28 일간 유지시킨다. 시험 중에 사망한 동물을 부검하며, 시험이 종결되면 살아남은 동물을 안락사 시키고 부검한다.
- (4) 시험물질은 전체표면적의 약 10 % 범위에 해당하는 투여면적에 균일하게 적용한다. 독성이 강한 물질은 도포면적을 보다 적게 하는 경우도 있으나 도포부위 전체를 가능하면 얇고 균일한 필름상태로 넓게 피복해야 한다. 시험물질은 24 시간의 노출기간 중 다공성의 거즈, 비자극성 테이프를 사용하여 피부와 접촉을 유지시키며 동물이 시험물질을 섭취하지 못하게 하여야 한다.

3.2 한계시험

본 시험방법을 이용하여 1,000 mg/kg이상의 용량시험에서 시험물질로 인한 관찰되는 독성영향이 없고 시험물질과 유사한 화학물질의 독성데이터를 참고할 때 본 시험물질의 독성이 예측되지 않으면, 3 개 용량을 사용한 본시험은 필요하지 않다.

3.3 관찰사항

- (1) 시험기간 동안 매일 1 회 이상 상세한 임상관찰을 한다. 독성영향의 시작시간, 정도 및 지속시간을 포함한 징후는 관찰 되는대로 정확히 기록한다. 동물의 증상은 피부, 체모, 눈 및 점막, 호흡기계, 순환기계, 자율신경 및 중추신경계, 전신운동능력 및 행동패턴을 포함하여 관찰한다. 매 주 사료 소비량을 측정하고, 동물의 무게를 측정한다. 동종포식, 조직의 자기분해, 잘못된 배치 등에 의해 동물이 손실되지 않도록 정기적으로 관찰한다.
- (2) 매 주 사료 소비량을 측정하고, 동물의 무게를 측정한다.

- (3) 시험이 끝난 후, 시험군 중 살아남은 모든 동물은 안락사 시키고, 빈사상태의 동물이 관찰되면 안락사 시킨다.

3.4 검사항목

- (1) 모든 동물에 대해 생화학적 검사를 한다. (주 2) 소변검사는 일상적 기준으로는 필요하지 않으며, 신장 독성 등 주요 독성이 예측되거나 확인될 경우에는 소변검사를 실시한다.
- (2) 모든 동물은 전체 부검을 실시하며 전체 육안적 병리 변화를 기록한다. 간, 신장, 부신, 고환은 해부 후 신속히 습중량을 측정한다. 분리된 기관과 조직은 향후 가능한 병리조직학적 검사를 위해 적정한 고정액 내에 보존한다. (주 3)
- (3) 대조군 및 고용량 시험군에 속하는 모든 동물의 정상 및 처치된 피부, 그리고 기관과 조직에 관해서는 완전한 조직병리학 검사를 수행한다. 모든 전체 병소를 검사한다. 다른 투여용량 군내에 있는 표적 기관을 검사해야 한다. 회복군은 다른 시험군에서 영향이 나타난 기관과 조직에 대해 조직학적 검사를 실시한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

- (1) 결과는 표로 요약한다. 각 시험군 별로 시험시작 시 동물 수, 병소를 나타내는 동물의 수, 병소의 유형과 각 병소의 유형을 나타내는 동물의 백분율을 나타낸다. 관찰된 모든 결과는 적절한 통계적 방법으로 평가한다.
- (2) 결과는 시험물질의 투여량, 이상의 유무, 발생률과 심각도간의 관계 및 거동 및 임상이상, 전체 병소, 표적기관, 체중변화, 사망률에 미치는 영향 및 독성영향을 포함하도록 한다.

2. 시험결과의 보고

시험보고는 다음의 항목을 포함한다.

2.1 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명

2.3 시험물질

- (1) 식별정보 및 CAS 번호

- (2) 물리적 성질과 순도
- (3) 이화학적 성질
- (4) 시험물질의 안정성
- (5) 시험물질의 용매 내에서의 용해도와 안정성

2.4 용매/보조제 종류 및 선정근거

2.5 시험 동물

- (1) 동물의 종/계통
- (2) 동물의 수, 주령, 성별
- (3) 구입처, 사육환경, 사료
- (4) 동물의 체중범위, 각 그룹별 평균 및 표준 편차를 포함하여, 시험을 시작 및 종료할 때 동물의 개별 중량

2.6 결과

- (1) 독성 및 기타영향
- (2) 성별 및 투여량 별 독성반응 데이터
- (3) 시험 중 사망한 시간 또는 시험 종료 시 동물의 생존여부
- (4) 각 이상 징후 및 후속과정 관찰시간
- (5) 사료 및 체중 데이터
- (6) 혈액학적 시험 결과
- (7) 임상 생화학 시험 결과
- (8) 부검 조사결과
- (9) 모든 병리조직학적 조사결과에 대한 상세한 설명 및 통계적 처리

2.7 결론

주 1) 투여 용량 설정 기준

- (1) 1 개 이상 중간 투여량 이용 시, 독성효과가 단계적으로 나타나도록 투여량 수준에는 적절한 간격을 둔다.
- (2) 최고 용량수준을 이용하면 독성 영향이 발생해야 하지만, 평가에 영향을 미칠만한 사망이 발생해서는 안 된다.
- (3) 고용량 단계에서 심각한 피부자극성이 발생하면 농도를 줄일 수 있다. 단, 시험 초기에 피부가 심하게 손상되면 연구를 종료하고 저용량에서 새로운 연구를 수행 할 필요가 있다.
- (4) 중간 용량은 최소한의 독성영향이 생기는 수준을 설정한다.
- (5) 최저 용량수준에서 독성이 발생하지 않고, 인체 노출에 대한 추정치를 이용할 수 있는 경우, 최저 용량수준은 이를 초과해야 한다.
- (6) 저용량과 중간용량 및 대조군에서는 유의한 결과를 도출하기 위해 사망 발생률이 낮아야한다.

주 2) 독성평가 항목

- (1) 안과학적 검사 : 시험물질에 노출되기 전과 시험이 종료될 때 검안경이나 동등한 적합한 장비를 이용한 안과학적 검사를 해야 하며, 모든 동물에서 시행하면 더 좋지만 최소한 고 투여량 그룹 및 대조군에서는 검사해야 한다. 눈에서 변화가 검출되면 모든 동물을 검사해야 한다.
- (2) 혈액학적 평가 항목 : 적혈구용적률(Hematocrit), 헤모글로빈 농도, 적혈구 수, 전체 및 차이 백혈구 수, 그리고 응고 시간, 프로트롬빈 시간, 또는 트롬보플라스틴 시간과 같은 응고 잠재력, 또는 혈소판 수의 측정을 포함한 혈액학을 시험 기간이 끝났을 때 조사해야 한다.
- (3) 임상 생화학 측정 항목 : 칼슘, 인, 염화물, 나트륨, 칼륨, 공복시 글루코오스(종에 적절한 금식 기간과 함께), 효소활성(Glutamic-pyruvic transaminase, glutamic oxalaocetic transaminase, ornithine decarboxylase, gamma glutamyl transpeptidase), 요소 질소(urea nitrogen), 알부민, 혈액 크레아티닌, 총 빌리루빈 및 총 혈청 단백질 량

주 3) 병리조직학적 검사를 위해 보전해야 하는 조직

- (1) 모든 전체 병소, 수질/뇌교 부분을 포함한 뇌, 소뇌 피질 및 대뇌 피질, 뇌하수체, 갑상선/부갑상선, 흉선, 폐, 심장, 대동맥, 침샘, 간, 비장, 신장, 부신, 췌장, 생식샘, 보조 성 기관, 담낭(존재하면), 식도, 위, 십이지장, 공장, 회장, 맹장, 결장, 직장, 방광, 대표 림프절, 말초신경
- (2) 독성의 징후가 있거나 표적 기관과 관련된다고 표시되는 경우: 기도, 암컷 유선, 넓적다리 근육계, 눈, 골수를 포함한 흉골, 관절면을 포함한 대퇴골, 세 가지 레벨에서 척수 (경부, 중간 흉부 및 요추), 눈외 눈물샘.

제10항 28 일 반복 흡입투여독성시험

I. 개요

1. 목적

본 시험은 28 일 동안 시험물질을 매일 반복흡입 노출시켜 발생할 가능성이 있는 시험물질의 독성을 평가하고, 추가적으로 90 일 반복 흡입투여독성 연구를 위한 용량선정에 관한 정보를 얻는데 목적이 있다.

2. 용어 정의

2.1 용량 (Dose)

노출물질의 양. 실험동물에 노출되는 공기 중 시험물질의 농도를 나타내며 단위는 노출되는 공기의 단위부피당 시험물질의 양 (mg/L, 에어로졸 및 증기의 경우) 또는 시험물질의 부피 (ppm, 가스의 경우)로 표시됨.

2.2 기관지폐포세척 (BAL, Bronchoalveolar lavage)

기관지에 튜브를 통해 식염수를 주입하고 폐포 내에 차 있는 세포 및 물질을 획득하기 위한 세척 (또는 세척액). BAL액 내 총 세포수와 호중구, 호산구, 대식세포 등의 세포수를 측정하여 반복 흡입 노출에 따른 독성을 평가하는데 이용

2.3 무악영향관찰용량 (NOAEL, No observed adverse effect level)

시험물질을 시험동물에 투여하였을 때 시험동물에 어떠한 독성증상도 나타나지 않을 것으로 기대되는 최대 용량 또는 농도

2.4. 최소악영향관찰용량 (LOAEL, Low observed adverse effect level)

시험물질을 시험동물에 투여하였을 때 시험동물에 독성을 나타내는 최소 용량 또는 농도

2.5 회복군 (Satellite group, Recovery group)

시험물질의 투여 종료 후 시험물질에 기인한 독성증상이 지연, 유지 또는 회복되는 지를 확인하기 위하여 필요시 추가하는 동물군

2.6 빈사상태 (Moribund status)

시험물질의 독성에 의하여 시험동물이 죽어가는 상태 또는 생존할 가망이 없는 상태

II. 시험

1. 원리

대조군 및 최소 3 개 용량의 시험군에 시험물질을 28 일간 반복 흡입 노출 시켜, 투여 기간 동안 동물의 독성 징후 관찰 및 시험 종결 후 남은 동물에 대해 부검 및 병리학적 분석을 통하여 시험물질의 호흡 노출에 따른 독성 가능성을 평가한다.

2. 시험의 준비

2.1 시험동물

- (1) 시험동물로 선호되는 설치류 종은 랫드이며, 생후 7 주령 ~ 9 주령 미만의 건강한 수컷과 임신 및 출산의 경험이 없는 암컷을 사용 한다. 만약 다른 설치류 종을 이용하는 경우에는 그 근거와 적정성을 제시하여야 한다.
- (2) 체중은 각 성별 평균 체중의 $\pm 20\%$ 이내여야 한다. 동물을 시험 전 최소한 5 일 동안 실험실 조건에 익숙해지게 한 후, 무작위로 시험군과 대조군에 할당한다. 시험동물은 개별 표시하며, 각 투여 용량 별 최소 10 마리 (암컷 5 마리, 수컷 5 마리)를 사용 한다.
- (3) 동물의 사용을 최소화하고 시험의 질적 수준을 향상시키기 위해서 시험물질에 대한 이용 가능한 모든 정보를 활용한다. 빈사상태의 동물이나 질병 및 고통이 지속되는 동물은 인도적으로 안락사 시킨다.

2.2 사육조건

- (1) 시험동물실의 온도는 $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, 습도는 $30\% \sim 70\%$ 가 유지되도록 한다. 인공조명으로 매 12 시간 간격으로 점멸한다. 사료는 일반적으로 널리 쓰는 것을 사용하며, 음용수는 자유로이 섭취시킨다.
- (2) 비부로 노출되는 시험동물은 순화기간 동안 노출튜브에 대한 적응훈련이 필요

하다. 전신 노출되는 동물들은 노출 시간동안 개별적으로 사육하여, 노출 시 실험물질의 피모(Fur)를 통한 다른 동물로의 오염을 방지한다.

2.3 흡입 챔버

노출 모드는 비부 노출이 선호된다. 하는 것으로 액체나 고체 에어로졸, 에어로졸을 형성하도록 응결될 수 있는 증기에 대해서는 비부 노출시킨다. 전신 노출모드 사용 시 그 적정성이 제시되어야 하며, 전신노출 사용 시 사용 동물의 총 용적을 챔버 용적의 5 % 이내로 한다.

2.4 시험물질

가스, 증기, 에어로졸, 또는 그 혼합물 형태로 시험물질을 노출 시킨다. 습기를 흡수하며 화학적 반응을 보이는 시험물질은 건조 공기 조건 하에서 시험한다. 에어로졸을 형성하도록 응결될 수 있는 모든 에어로졸과 증기에 대해서는 입자 크기를 결정해야 한다. 호흡기관의 관련 부위를 모두 노출시키기 위해서는, 기하학적 표준편차(σ_g)가 1.5 ~ 3.0 내에 있고 공기역학중량평균지름(MMAD)의 범위가 $1\ \mu\text{m}$ ~ $3\ \mu\text{m}$ 인 에어로졸을 권장한다. 단 이러한 기준치를 벗어날 가능성이 있는 시험물질에 대해서는 이에 대한 적절한 판단 및 근거를 제시한다.

3. 시험 방법

3.1 시험물질의 투여

- (1) 노출 시 한계 농도는 (주 1)에 따라 설정한다.

3.2 용량 설정 시험

- (1) 28 일간 반복 흡입독성시험의 본시험을 수행하기 전 용량 설정 시험을 수행 할 것을 권장한다. 분석 방법, 입경 분포, 독성 기전 임상 병리, 조직 병리 및 본 시험에서의 무해용량 예측에 대한 기술적인 정보들을 제공한다.
- (2) 하나 또는 그 이상의 농도군으로 구성하여 수행하며, 시험의 목적에 따라서 각 3 마리 ~ 6 마리의 수컷과 암컷 동물들을 사용하며, 노출 기간은 5 일 이상으로 하며 14 일을 초과하지 않는다.

3.3 노출 (본시험)

- (1) 음성(공기)대조군 또는 용매 대조군을 포함하여 일반적으로 3 개 농도를 설정한다. 음성(공기)대조군은 시험군과 동일한 방법으로 취급한다. 물을 용매로 사용할 경우에는 상대 습도가 동일한 공기에 노출한다. 한 성별에 대한 특이성이 있을 경우 성별로 다른 농도를 설정할 수도 있다.
- (2) 시험물질은 4 주 동안(28 일) 주당 5 일, 매일 6 시간 동안 시험동물에 노출시키며, 흡입제제의 경우 매주 7 일 동안의 노출도 가능하다. 노출 시간 (최대 6 시간 미만일 때) 중에는 사료를 제공하지 않고, 전신 노출 시 음용수는 공급할 수 있다.
- (3) 고용량은 독성이 나타나는 농도이어야 하지만, 평가에 장애가 되거나 사망이 발생할 농도이어서는 아니된다. 저용량은 독성이 나타나지 않아야 한다.

3.4 회복군

음성(공기) 또는 용매 대조군과 최고 농도 수준에서 각 군별 수컷 5 마리와 암컷 5 마리로 구성한다. 회복군의 관찰기간은 일반적으로 14 일 정도로 한다.

3.5 투여

다음의 사항에 관하여 측정 또는 모니터링을 행한다.

3.5.1 챔버 기류

챔버의 공기 흐름은 노출 시간 동안 최소한 한 시간 간격으로 기록한다. 비부노출시키는 챔버 안에서는 동물의 재호흡을 방지한다. 산소농도는 최소 19 % 이상 유지시키고, 이산화탄소 농도는 1 %를 초과해서는 안 된다.

3.5.2 온도와 습도

챔버 온도는 $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 를 유지한다. 동물의 호흡 구역 내 습도는 30 % ~ 70 %가 유지하며, 노출 시간동안 연속적으로 관찰하고 매 시간 기록한다.

3.5.3 설정 농도 (Nominal concentration)

설정 농도는 흡입 챔버 시스템을 통과한 총 공기량에 대한 생성된 시험물질의 질량의 비로 나타낸다.

3.5.4 실측 농도 (Actual concentration)

- (1) 동물의 호흡구역 내에서 표본을 추출하여 시험물질의 실측 농도를 측정한다.

매우 복잡한 혼합물은 각 위상(가스/증기 및 에어로졸)의 최소한 1 개 지표물질 (분해물질 또는 활성물질)을 선택하여 측정한다. 제형형태의 혼합물 시험물질은 전체 제형에 대한 분석 농도를 측정한다.

- (2) 노출 대기를 일정하게 유지하며, 각 노출일 중 농도별 최소한 3 회 측정한다. 시험물질의 챔버 평형을 달성할 때까지의 시간을 계산하여 기록하며, 실제 농도는 가스 및 증기의 경우 목표하는 농도에서 $\pm 10 \%$, 액체 및 고체 에어로졸의 경우 $\pm 20 \%$ 를 유지되어야 한다.

3.5.5 입자크기 분포 (Particle size distribution)

입자크기 분포는 노출 시간 동안 농도별 최소한 주 1 회 이상 Cascade impactor 또는 이에 상응하는 대체 장비(공기 역학 입자 정립기 등)들을 이용하여 측정한다. 측정 장비들은 측정 결과의 통일성 및 수거 효율이 입증되어야 한다. 에어로졸 형성 및 혼합 위상의 물질일 경우 대기 속에서 입자가 검출되면, 증기에 대한 입자크기를 측정한다.

3.6 관찰사항

- (1) 노출 기간 이전, 노출 중 및 노출 이후에 각 동물 별 개별 관찰 사항을 기록한다.(주 2) 안락사 시킨 경우 나 사망하였을 경우에는 사망 시간을 기록한다.
- (2) 동물의 체중은 첫 번째 노출 당일 측정하여 기록하고 및 그 이후에는 주당 2 회 실시 한다. 첫 2 주 노출 동안에 특별한 체중 변화가 관찰되지 않을 경우, 남은 시험 기간 동안 주 1 회만 측정 할 수 있다. 회복 기간 내의 회복군의 체중은 주간으로 측정한다. 시험 종료 시 안락사 시키기 직전에 모든 동물의 체중을 측정하여 기록한다.
- (3) 사료섭취량은 주 1 회 이상 주기적으로 측정해야 하며, 음용수섭취량은 시험 목적에 따라 측정할 수 있다.

3.7. 검사항목

- (1) 임상병리학적 평가는 대조군과 회복군을 포함한 모든 동물에 대해서 수행하며 안락사 시킨 동물도 포함한다.(주 3) 시험물질의 독성학적 영향에 대하여 보다 주의 깊은 평가가 필요한 경우 시험책임자는 측정항목을 추가 할 수 있다.(주 4) 시험물질에 의한 하부기도(폐포)에 독성이 예측되는 경우, 기관지폐포세척(BAL)

을 실시하여 조직병리 검사 결과를 보완할 수 있다.

- (2) 시험에 사용된 모든 시험동물(사망동물과 관찰기간이 끝난 생존동물)에 대하여는 안락사 시켜 부검을 실시하고 육안 병리검사를 수행한다. 일정에 따라 계획된 안락사 실시 이전에 사망한 동물은 충분히 낮은 온도의 냉장상태(냉동 아님)로 보관하며 가능한 하루나 이틀 이내에 부검한다. 각 동물의 최종 노출 종료 시간과 안락사 사이의 시간을 기록한다.
- (3) 모든 육안 병리검사 결과는 개별적으로 각각의 동물에 대해서 기록하여야 하고 특히 호흡기 계통의 변화에 대해서는 주의깊게 수행하여야 한다. 조직병리검사를 위하여 육안 병리검사 시 적절한 고정액에 고정해야 하는 장기 및 조직은 (주 5)에 제시하고 있다.
- (4) 대조군 및 고용량 시험군과 시험 수행 중 사망한 동물들에 조직병리검사를 수행한다.(주 5) 고용량 시험군의 장기 및 조직에서 조직병리검사 결과 시험물질에 기인한 증상이 관찰된 경우 모든 시험군에 대한 검사를 실시한다. 시험에서 회복군을 둔 경우, 시험군에서 영향이 확인된 모든 장기와 조직에서 조직병리 검사를 수행한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

- (1) 결과는 표로 요약한다. 체중, 사료섭취량, 임상 병리학, 기관 중량 및 조직병리학에 관한 개별 동물 측정치가 제시되어야 한다.
- (2) 각 시험군 별로 동물의 수, 특정 독성 징후를 나타내는 동물의 수, 시험 중에 죽었다고 판명되었거나 인도적 이유 때문에 죽었던 동물의 수, 개별 동물의 사망 시각, 독성 영향 및 가역성에 대한 설명 및 시간 과정, 그리고 부검 조사결과를 표 형태로 요약 한다. 시험 결과는 연구 설계 중 선택된 통계적 방법으로 평가한다.
- (3) 입자 크기 기준을 충족시킬 수 없다면, 조사결과를 감안한 입자의 호흡 가능성을 다뤄야 하며, 실측 농도와 설정 농도와의 관계가 시험의 전반적 평가에 포함한다.
- (4) 사망의 원인과 독성작용기전을 추정하고, 심각하고 지속적인 통증을 나타내는 동물의 안락사에 대한 설명 및 표적기관 확인한다.

(5) 무악영향관찰량 및 최소악영향관찰량 결정

2. 시험결과의 보고

시험보고서는 다음의 항목을 포함한다.

2.1 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명

2.3 시험물질 정보

(1) 식별정보 및 CAS 번호

(2) 물리적 성질과 순도

(3) 연구 시행과 관련되는 물리 화학적 특성 : 용해도 특성, 용해점, 비등점, pH(적절한 경우), 기압자료(가능한 경우)

2.4 용매/보조제 종류

(1) 물 이외의 용매 사용의 적정성 자료

2.5 시험동물

(1) 동물의 종/계통

(2) 동물의 수, 주령, 성별

(3) 구입처, 사육환경, 사료

(4) 동물 군 분리시의 무작위 추출 방법

(5) 케이지 당 동물수 (변경사항)

(6) 사료, 검역, 질환에 대한 처치를 포함한 사전 시험 조건

2.6 시험조건

(1) 시험 물품 준비 내역

(2) 시험 대기 생성, 노출에 사용한 장비에 대한 설명

(3) 챔버 온도, 습도, 기류를 모니터 하기 위해 사용한 장비 내역

(4) 챔버 농도 및 입자 크기 분포 결정용 표본 수집 장비의 내역

(5) 사용한 화학적 분석 방법의 내역 및 방법 검증

(6) 무작위 추출 방법

(7) 사료 및 음용수의 내역

(8) 시험 농도 선택에 대한 이론적 근거

2.7 흡입 챔버

- (1) 용적 및 다이어그램을 포함하여 흡입 챔버에 대한 상세한 설명
- (2) 대기 생성은 물론 동물 노출용으로 사용된 장비의 구입처와 설명
- (3) 온도, 습도, 입자 크기 및 실제 농도를 측정하기 위한 장비
- (4) 조절용으로 사용된 공기와 시스템의 출처
- (5) 동질적 시험 대기를 보장하기 위해 장비의 교정에 사용된 방법
- (6) 차압(양압 및 음압)
- (7) 챔버당 노출 포트(코 전용); 챔버 내 동물의 위치(전신)
- (8) 시험 대기의 안정성
- (9) 온도 및 습도 센서의 위치와 챔버 내 시험 대기의 표본 추출
- (10) 공급된/추출된 공기의 처리
- (11) 송풍량, 송풍량/노출 포트(비부 노출), 또는 동물 하중/챔버(전신)
- (12) 흡입 챔버 평형까지의 시간(t_{95})
- (13) 시간당 용적 변경의 수
- (14) 해당하는 경우 계측장치

2.8 노출 자료

- (1) 공기 농도는 질량 단위(mg/L , mg/m^3 등)로 보고한다.
- (2) 본시험에서 표적 농도 선택에 대한 이론적 근거
- (3) 설정농도
- (4) 동물의 호흡 구역으로부터 채취한 실측농도
- (5) 계산방법을 포함한 입자크기 분포, 공기역학중량평균지름(MMAD), 기하학적 표준편차(σ_g), 개별 입자크기 분석

2.9 결과

- (1) 체중/체중 변화
- (2) 사료섭취량과 음용수섭취량 (필요시)
- (3) 독성 징후를 포함한 성별 및 용량별 독성 반응 자료
- (4) 시험 중 사망한 시간 또는 시험 종료 시 동물의 생존여부
- (5) 임상 관찰의 성격, 심각도와 지속기간(가역성 여부와 상관없이)
- (6) 혈액학적 시험 결과
- (7) 임상 생화학 시험 결과
- (8) 안락사 당시의 체중 및 기관 중량 측정 자료

- (9) 부검 조사결과
- (10) 모든 병리조직학적 조사결과 및 설명
- (11) 챔버 온도, 습도, 공기 유량
- (12) 챔버의 설정농도 및 실측 농도 자료
- (13) 입자크기 분포 및 공기역학중량평균지름(MMAD)의 계산 등을 포함한 입자 크기 자료
- (14) 결과의 적절한 통계적 처리

2.10 결론

주 1) 한계 농도 설정

- (1) 급성시험과 달리, 28 일간의 아급성 흡입 독성시험에는 규정된 한계 농도가 없다.
- (2) 시험한 최고 농도에 대해서는 다음 사항을 고려하여 설정한다.
 - ① 최대한 달성 가능한 농도
 - ② “최악의 경우” 사람에 대한 노출 수준
 - ③ 적절한 산소 공급을 유지해야 할 필요성
 - ④ 동물 복지 고려사항
- (3) 데이터에 기반한 한계농도가 별도로 없으면, 유엔 화학물질의 분류 및 표지에 관한 세계 조화 시스템의 급성 한계농도가 사용될 수 있다.
 - ① 에어로졸에 대해서는 5 mg/L
 - ② 증기에 대해서는 20 mg/L
 - ③ 가스에 대해서는 20,000 ppm
- (4) 가스나 휘발성이 매우 높은 시험 물품(예컨대, 냉매)을 시험할 때 이 한계를 초과할 필요가 있다면 정당성을 입증한다.

주 2) 임상관찰사항

- (1) 피부와 털, 눈, 그리고 점막 변화; 호흡기계 및 순환계 변화, 신경계 변화, 그리고 운동 활동 및 거동 패턴 변화
- (2) 떨림, 경련, 타액 분비, 설사, 무기력, 수면, 그리고 혼수상태에 대한 관찰
- (3) 직장 온도를 측정을 통한 처치나 보정에 관련된 반사적 호흡완서 또는 저/고체 온에 대한 보충 증거
- (4) 연구 프로토콜에 동력학, 생물 감시, 폐 기능, 폐 조직에 누적되는 잘 녹지 않는 물질의 보유, 그리고 거동 변화와 같은 추가 평가가 포함될 수 있다.

주 3) 표준 임상 병리학 파라미터

- (1) 혈액학 검사 항목 : 적혈구 수, 전체 백혈구 수, 헤마토크릿, 분화(Differential) 백혈구 수, 헤모글로빈 농도, 혈소판 수, 평균 혈구 헤모글로빈, 평균 혈구 양, 평균 혈구 헤모글로빈 농도, 망상적혈구, 응고 가능성(택1, 프로트롬빈 시간, 응고 시간, 부분 트롬보플라스틴 시간)
- (2) 생화학 검사 항목 : 글루코오스 (야간 공복 후), 총 콜레스테롤, 트리글리세라이

드, 혈액 요소성 질소, 총 빌리루빈, 크레아티닌, 총 단백질, 알부민, 글로불린, 알라닌 아미노기 전이효소, 아스파르트산염 아미노기 전이효소, 알칼리 인산가수분해효소, 칼륨, 나트륨, 칼슘, 인, 염화물

- (3) 뇨 검사 항목 (선택사항) : 외관(색상 및 혼탁도), 총 단백질, 용적, 글루코오스, 비중 또는 삼투압, 혈액/혈구, pH

주 4) 시험물질의 독성의 특성화를 위해 추가 평가 항목 :

Cholinesterase, 지질, 호르몬, 산/염기 균형, 메트헤모글로빈(Methaemoglobin) 또는 하인츠(Heinz) 소체, Creatine kinase, 골수/적혈구 비율, 트로포닌, 동맥피가스, lactate dehydrogenase, sorbital dehydrogenase, glutamate dehydrogenase, gamma glutamyl transpeptidase

주 5) 전체 부검 중에 보존할 기관 및 조직

- (1) 육안 병리검사 시 적절한 고정액에 고정해야 한다.
- (2) 갑상선과 부고환의 중량을 정확히 측정하기 위해 결체조직 등을 제거하다보면 이러한 과정이 병리조직학적 평가를 방해할 수 있기 때문에 필요한 경우에만 중량을 달아야 한다.
- (3) 폐는 온전하게 제거하여, 무게를 달고, 폐 조직이 유지되도록 확실히 하기 위해 20 cm ~ 30 cm의 물 압력에서 고정하고, 기관지를 포함한 모든 엽(lobes)에 대한 부분을 1 개 부위에서 수거해야 하지만, 폐 세척을 수행한다면, 세척되지 않은 엽을 3 개 부위(연속절편이 아닌)에서 절개해야 한다.
- (4) 비인두 조직의 최소한 4 개 부위를 검사해야 하며, 편평 상피, 이행 상피(무섬모 호흡기), 호흡기(섬모 호흡기) 및 후각 상피, 그리고 배수 림프 조직(NALT)을 적절히 검사할 수 있도록 하기 위해 그 중 하나에 비인두관이 포함되어야 한다. 후두의 3 개 부위를 검사해야 하며, 이 레벨 중 하나에 후두개의 바닥이 포함되어야 한다. 폐 외부 기관지의 분기 용골을 통한 1 개 세로 부분과 1 개 가로 부분을 포함한 기도의 최소한 2 개 부위를 검사해야 한다.
- (5) 부검 조직 목록 : 골수(및/또는 새로운 흡인물), 후두(3 개 부위, 1 개 부위는 후두개의 바닥 포함), 비인두 조직(최소한 4 개 부위; 1 개 부위는 비인두관 및 비강 연관 면역조직(NALT) 포함), 난소, 정낭, 척수(경부, 중간 흉부 및 요추), 위,

갑상선, 기도(용골을 통한 1 개 세로 부분과 1 개 가로 부분을 포함한 최소한 2 개 부위), 자궁, 전체 병소 모두

(6) 보존을 위해 잘 다음어져야 하는 기관 및 조직 목록 : 부신, 비장, 뇌(대뇌, 소뇌 및 수질/뇌교 부분 포함), 심장, 신장, 고환, 흉선, 간, 폐(기관지를 포함한 모든 엽을 1 개 부위에)

(7) 연구 지도자의 판단에 따라 보존될 수 있는 기관 및 조직 : 눈(망막, 시신경) 및 눈꺼풀, 방광, 후각 신경구

제11항 90 일 반복 흡입투여독성시험

I. 개요

1. 목적

본 시험은 90 일 동안 시험물질을 매일 반복흡입 노출시켜 발생할 가능성이 있는 시험물질의 독성을 평가하고, 추가적으로 만성 흡입독성시험을 위한 용량선택에 관한 정보를 얻는데 목적이 있다.

2. 용어 정의

2.1 용량 (Dose)

노출물질의 양. 실험동물에 노출되는 공기 중 시험물질의 농도를 나타내며 단위는 노출되는 공기의 단위부피당 시험물질의 양 (mg/L, 에어로졸 및 증기의 경우) 또는 시험물질의 부피 (ppm, 가스의 경우)로 표시됨.

2.2 기관지폐포세척 (BAL, Bronchoalveolar lavage)

기관지에 튜브를 통해 식염수를 주입하고 폐포 내에 차 있는 세포 및 물질을 획득하기 위한 세척 (또는 세척액). BAL액 내 총 세포수와 호중구, 호산구, 대식세포 등의 세포수를 측정하여 반복 흡입 노출에 따른 독성을 평가하는데 이용

2.3 무악영향관찰용량 (NOAEL, No observed adverse effect level)

시험물질을 시험동물에 투여하였을 때 시험동물에 어떠한 독성증상도 나타나지 않을 것으로 기대되는 최대용량

2.4. 최소악영향관찰용량 (LOAEL, Low observed adverse effect level)

시험물질을 시험동물에 투여하였을 때 시험동물에 독성을 나타내는 최소용량

2.5 빈사상태 (Moribund status)

시험물질의 독성에 의하여 시험동물이 죽어가는 상태 또는 생존할 가망이 없는 상태

2.6 회복군 (Satellite group, Recovery group)

시험물질의 투여 종료 후 시험물질에 기인한 독성증상이 지연, 유지 또는 회복되는 지를 확인하기 위하여 필요시 추가하는 동물군

II. 시험

1. 원리

대조군 및 3 개 용량의 시험군에 시험물질을 90 일간 (쥐 수명의 약 10 %) 반복 흡입 노출 시켜, 투여 기간 동안 동물의 독성 징후를 관찰하고 시험 종결 후 남은 동물에 대해 부검 및 병리학적 분석을 통하여 시험물질의 호흡 노출에 따른 독성 가능성을 평가 한다.

2. 시험의 준비

2.1 시험동물

- (1) 시험동물로 선호되는 설치류 종은 랫드이며, 생후 9 주령 미만의 건강한 수컷과 임신 및 출산의 경험이 없는 암컷을 사용 한다. 만약 다른 설치류 종을 이용 하는 경우에는 그 근거와 적성성을 제시하여야 한다.
- (2) 체중은 각 성별 평균 체중의 $\pm 20\%$ 이내여야 한다. 동물을 시험 전 최소한 5 일 동안 실험실 조건에 익숙해지게 한 후, 무작위로 시험군과 대조군에 할당한다. 시험동물은 개별 표시하며, 각 투여 용량 별 최소 20 마리 (암컷 10 마리, 수컷 10 마리)를 사용 한다.
- (3) 동물의 사용을 최소화하고 시험의 질적 수준을 향상시키기 위해서 시험물질에 대한 이용 가능한 모든 정보를 활용한다. 빈사상태의 동물이나 질병 및 고통이 지속되는 동물은 인도적으로 안락사 시킨다.

2.2 사육조건

- (1) 시험동물실의 온도는 $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, 습도는 30 % ~ 70 %가 유지되도록 한다. 인공조명으로 매 12 시간 간격으로 점멸한다. 사료는 일반적으로 널리 쓰는 것을 사용하며, 음용수는 자유로이 섭취시킨다.
- (2) 비부로 노출되는 시험동물은 순화기간 동안 노출튜브에 대한 적응훈련이 필요

하다. 전신 노출되는 동물들은 노출 시간동안 개별적으로 사육하여, 노출 시 실험물질의 피모(Fur)를 통한 다른 동물로의 오염을 방지한다.

2.3 흡입 챔버

선호되는 노출 모드는 비부 노출하는 것으로 액체나 고체 에어로졸, 에어로졸을 형성하도록 응결될 수 있는 증기에 대해서는 비부 노출시킨다. 전신 노출모드 사용 시 정당성이 제시되어야 하며, 전신노출 사용 시 사용 동물의 총 용적을 챔버 용적의 5 % 이내로 한다.

2.4 시험물질

가스, 증기, 에어로졸, 또는 그 혼합물 형태로 시험물질을 노출 시킨다. 습기를 흡수하며 화학적 반응을 보이는 시험물질은 건조 공기 조건 하에서 시험한다. 에어로졸을 형성하도록 응결될 수 있는 모든 에어로졸과 증기에 대해서는 입자 크기를 결정해야 한다. 호흡기관의 관련 부위를 모두 노출시키기 위해서는, 기하학적 표준편차(og)가 1.5 ~ 3.0 내에 있고 공기역학중량평균지름(MMAD)의 범위가 1 μm ~ 3 μm 인 에어로졸을 권장한다. 단 이러한 기준치를 벗어날 가능성이 있는 시험물질에 대해서는 이에 대한 적절한 판단 및 근거를 제시한다.

3. 시험 방법

3.1 시험물질의 투여

- (1) 노출 시 한계 농도는 (주 1)에 따라 설정한다.

3.2 용량 설정 시험

- (1) 90 일간 반복 흡입독성시험의 본시험을 수행하기 전 용량 설정 시험을 수행 할 것을 권장한다. 분석 방법, 입경 분포, 독성 기전의 발견, 임상 병리, 조직 병리 및 본 시험에서의 무해용량 예측에 대한 기술적인 정보들을 제공한다.
- (2) 하나 또는 그 이상의 농도군으로 구성하여 수행하며, 시험의 목적에 따라서 각 3 마리 ~ 6 마리의 수컷과 암컷 동물들을 사용하며, 노출 기간은 5 일 이상으로 하며 28 일을 초과하지 않는다.

3.3 노출 (본시험)

- (1) 음성(공기)대조군 또는 용매 대조군을 포함하여 일반적으로 최소 3 개 농도로 설정한다. 음성(공기)대조군은 시험군과 동일한 방법으로 취급한다. 물을 용매로 사용할 경우에는 상대 습도가 동일한 공기에 노출한다.
- (2) 시험물질은 13 주 동안(90 일) 주당 5 일, 매일 6 시간 동안 시험동물에 노출시키며, 흡입제제의 경우 매주 7 일 동안의 노출도 가능하다. 한 성별에 대한 특이성이 있을 경우 성별로 다른 농도를 설정할 수도 있다. 노출 시간 (최대 6 시간 미만일 때) 중에는 사료를 제공하지 않고, 전신 노출 시 물은 공급 할 수 있다.
- (3) 고용량은 독성이 나타나는 농도이어야 하지만, 평가에 장애가 되거나 사망이 발생할 농도이어서는 아니 된다. 저용량은 독성이 나타나지 않아야 한다.

3.4 회복군

음성(공기) 또는 용매 대조군과 최고 농도 수준에서 각 군별 수컷 10 마리와 암컷 10 마리로 구성한다. 회복군의 관찰기간은 일반적으로 14 일 정도로 한다.

3.5 투여

다음의 사항에 관하여 측정 또는 모니터링을 행한다.

3.5.1 챔버 기류

챔버의 공기 흐름은 노출 시간 동안 최소한 한 시간 간격으로 기록한다. 비부 노출시키는 챔버 안에서 동물의 재호흡을 방지한다. 산소농도는 최소 19 % 이상 유지시키고, 이산화탄소 농도는 1 %를 초과해서는 안 된다.

3.5.2 온도와 습도

챔버 온도는 $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 를 유지한다. 동물의 호흡 구역 내 습도는 30 % ~ 70 %가 유지하며, 노출 시간동안 연속적으로 관찰하고 매 시간 기록한다.

3.5.3 설정 농도 (Nominal concentration)

설정 농도는 흡입 챔버 시스템을 통과한 총 공기량에 대한 생성된 시험물질의 질량의 비로 나타낸다.

3.5.4 실측 농도 (Actual concentration)

- (1) 동물의 호흡구역 내에서 표본을 추출하여 시험물질의 실측 농도를 측정한다. 매우 복잡한 혼합물은 각 위상(가스/증기 및 에어로졸)의 최소한 1 개 지표

물질(분해물질 또는 활성물질)을 선택하여 측정한다. 제형형태의 혼합물 시험물질은 전체 제형에 대한 분석 농도를 측정한다.

(2) 노출 대기를 일정하게 유지하며, 각 노출일 중 농도별 최소한 3 회 측정한다. 시험물질의 챔버 평형을 달성할 때까지의 시간을 계산하고 기록하며, 실제 농도는 가스 및 증기의 경우 목표하는 농도에서 $\pm 10\%$, 액체 및 고체 에어로졸의 경우 $\pm 20\%$ 를 유지되어야 한다.

3.5.5 입자크기 분포 (Particle size distribution)

입자크기 분포는 노출 시간 동안 농도별 최소한 주 1 회 이상 Cascade impactor 또는 이에 상응하는 대체 장비(공기 역학 입자 정립기 등)들을 이용하여 측정한다. 측정 장비들은 측정 결과의 통일성 및 수거 효율이 입증되어야 한다. 에어로졸 형성 및 혼합 위상의 물질일 경우 대기 속에서 입자가 검출되면, 증기에 대한 입자크기를 측정한다.

3.6 관찰사항

- (1) 노출 기간 이전, 노출 중 및 노출 이후에 각 동물 별 개별 관찰 사항을 기록한다.(주 2) 인도적으로 안락사 시킨 경우나 사망하였을 경우 사망 시간을 기록한다.
- (2) 동물의 체중은 첫 번째 노출 당일 측정하여 기록하고 및 그 이후에는 주당 2 회 실시 한다. 첫 4 주 노출 동안에 특별한 체중 변화가 관찰되지 않을 경우, 남은 시험 기간 동안 주 1 회 측정한다. 회복 기간 내의 회복군의 체중은 주간으로 측정한다. 연구가 종료 시 안락사하기 직전에 모든 동물의 체중을 측정하여 기록한다.
- (3) 사료섭취량은 주 1 회 이상 주기적으로 측정해야 하며, 음용수 섭취량은 시험 목적에 따라 측정할 수 있다.

3.7 검사항목

- (1) 임상병리학적 평가는 대조군과 회복군을 포함한 모든 생존동물에 대해서 수행하며 안락사 시킨 동물도 포함한다.(주 3) 시험물질의 독성학적 영향에 대하여 보다 주의 깊은 평가가 필요한 경우 시험책임자는 측정항목을 추가 할 수 있다.(주 4) 시험물질에 의한 하부기도(폐포)에 독성이 예측되는 경우, 기관지폐포세척(BAL)을 실시하여 조직병리 검사 결과를 보완할 수 있다.

- (2) 검안경이나 동등한 장치를 이용하여, 시험물질을 투여하기 전 (모든 동물) 및 종료될 때 (모든 고농도군 및 대조군) 안저, 굴절 매체, 홍채 및 결막에 대한 안과학적 검사를 수행 한다. 눈에서 변화가 검출되면 회복군 동물을 포함한 다른 그룹에 속한 모든 동물을 검사한다.
- (3) 시험에 사용된 모든 시험동물(사망동물과 관찰기간이 끝난 생존동물)에 대하여는 안락사 시켜 부검을 실시하고 육안 병리검사를 수행한다. 일정에 따라 계획된 안락사 실시 이전에 사망한 동물은 충분히 낮은 온도의 냉장(냉동 아님)에 보관하며 가능한 하루나 이틀 이내에 부검한다. 각 동물의 최종 노출 종료 시간과 안락사 사이의 시간을 기록한다. 모든 육안 병리검사 결과는 개별적으로 각각의 동물에 대하여 기록되어야 하고 특히 호흡기 계통의 변화에 대해서는 주의 깊게 수행하여야 한다.
- (4) 조직병리검사를 위하여 장기 및 조직을 육안 병리검사 시 적절한 고정액에 고정해야 한다. (주 5) 다음어진 기관들은 건조를 피하기 위해 해부 후 가능한 빨리 습중량을 측정한다.
- (5) 대조군 및 고용량 시험군과 시험 수행 중 사망한 동물들에 조직병리검사를 수행한다.(주 5) 고용량 시험군의 장기 및 조직에서 조직병리검사 결과 시험물질에 기인한 증상이 관찰된 경우 모든 시험군에 대한 검사를 실시한다. 시험에서 회복군을 둔 경우, 시험군에서 영향이 확인된 모든 장기와 조직에서 조직병리검사를 수행한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

- (1) 결과는 표로 요약한다. 체중, 사료섭취량, 임상 병리학, 기관 중량 및 조직병리학에 관한 개별 동물 데이터가 제시 되어야 한다.
- (2) 각 시험군 별로 동물의 수, 특정 독성 징후를 나타내는 동물의 수, 시험 중에 죽었다고 판명되었거나 인도적 이유 때문에 죽었던 동물의 수, 개별 동물의 사망 시각, 독성 영향 및 가역성에 대한 설명 및 시간 과정, 그리고 부검 조사결과를 표 형태로 요약 한다. 시험 결과는 연구 설계 중 선택된 통계적 방법으로 평가한다.

2. 시험결과의 보고

시험보고서는 다음의 항목을 포함한다.

2.1 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명

2.3 시험물질 정보

- (1) 알려져 있는 경우 식별 데이터 및 CAS 번호
- (2) 물리적 성질과 순도
- (3) 시험 시행과 관련되는 물리 화학적 특성 : 용해도 특성, 용해점, 비등점, pH(적절한 경우), 기압자료(가능한 경우)

2.4 용매/보조제 종류

- (1) 물 이외의 용매 사용의 적정성 자료

2.5 시험동물

- (1) 동물의 종/계통
- (2) 동물의 수, 주령, 성별
- (3) 구입처, 사육환경, 사료
- (4) 동물군 분리시의 무작위 추출 방법
- (5) 케이지 당 동물수 (변경사항)
- (6) 사료, 검역, 질환에 대한 처치를 포함한 사전 시험 조건

2.6 시험조건

- (1) 시험 물품 준비 내역
- (2) 시험 대기 생성, 노출에 사용한 장비에 대한 설명
- (3) 챔버 온도, 습도, 기류를 모니터 하기 위해 사용한 장비 내역
- (4) 챔버 농도 및 입자 크기 분포 결정용 표본 수집 장비의 내역
- (5) 사용한 화학적 분석 방법의 내역 및 방법 검증
- (6) 무작위 추출 방법
- (7) 사료 및 음용수의 내역
- (8) 시험 농도 선택에 대한 이론적 근거

2.7 흡입 챔버

- (1) 용적 및 다이어그램을 포함하여 흡입 챔버에 대한 상세한 설명
- (2) 대기 생성은 물론 동물 노출용으로 사용된 장비의 구입처와 설명

- (3) 온도, 습도, 입자 크기 및 실제 농도를 측정하기 위한 장비
- (4) 조절용으로 사용된 공기와 시스템의 출처
- (5) 동질적 시험 대기를 보장하기 위해 장비의 교정에 사용된 방법
- (6) 차압(양압 및 음압)
- (7) 챔버당 노출 포트(코 전용) ; 챔버 내 동물의 위치(전신)
- (8) 시험 대기의 안정성
- (9) 온도 및 습도 센서의 위치와 챔버 내 시험 대기의 표본 추출
- (10) 공급된/추출된 공기의 처리
- (11) 송풍량, 송풍량/노출 포트(코 전용), 또는 동물 하중/챔버(전신)
- (12) 흡입 챔버 평형까지의 시간(t_{95})
- (13) 시간당 용적 변경의 수
- (14) 해당하는 경우 계측장치

2.8 노출 데이터

- (1) 공기 농도는 질량 단위(mg/L , mg/m^3 등)로 보고한다.
- (2) 본시험에서 표적 농도 선택에 대한 이론적 근거
- (3) 설정농도
- (4) 동물의 호흡 구역으로부터 채취한 실측농도
- (5) 계산방법을 포함한 입자크기 분포, 공기역학중량평균지름(MMAD), 기하학적 표준편차(σ_g), 개별 입자 크기 분석

2.9 결과

- (1) 체중/체중 변화
- (2) 사료섭취량과 음용수섭취량 (필요시)
- (3) 독성 징후를 포함한 성별 및 용량별 독성 반응 자료
- (4) 시험 중 사망한 시간 또는 시험 종료 시 동물의 생존여부
- (5) 임상 관찰의 성격, 심각도와 지속기간(가역성 여부와 상관없이)
- (6) 혈액학적 시험 결과
- (7) 임상 생화학 시험 결과
- (8) 안락사 당시의 체중 및 기관 중량 측정 자료
- (9) 부검 조사결과
- (10) 모든 병리조직학적 조사결과 및 설명

- (11) 챔버 온도, 습도, 공기 유량
- (12) 챔버의 이론 및 실제 농도 자료
- (13) 입자크기 분포 및 공기역학중량평균지름(MMAD)의 계산 등을 포함한 입자크기 자료
- (14) 결과의 적절한 통계적 처리

2.10 결론

주 1) 한계 농도 설정

- (1) 급성 시험과는 달리, 90 일간의 아급성 흡입 독성 시험에는 규정된 한계 농도가 없다.
- (2) 시험한 최고 농도에 대해서는 다음 사항을 고려하여 설정한다.
 - ① 최대한 달성 가능한 농도
 - ② “최악의 경우” 사람에 대한 노출 수준
 - ③ 적절한 산소 공급을 유지해야 할 필요성
 - ④ 동물 복지 고려사항
- (3) 데이터에 기반한 한계농도가 별도로 없으면, 유엔 화학물질의 분류 및 표지에 관한 세계 조화 시스템의 급성 한계농도 가 사용될 수 있다.
 - ① 에어로졸에 대해서는 5 mg/L
 - ② 증기에 대해서는 20 mg/L
 - ③ 가스에 대해서는 20,000 ppm
- (4) 가스나 휘발성이 매우 높은 시험 물품(예컨대, 냉매)을 시험할 때 이 한계를 초과할 필요가 있다면 정당성을 입증한다.

주 2) 임상관찰사항

- (1) 피부와 털, 눈, 그리고 점막 변화; 호흡기계 및 순환계 변화, 신경계 변화, 운동 활동 및 거동 패턴 변화
- (2) 떨림, 경련, 타액 분비, 설사, 무기력, 수면, 그리고 혼수상태에 대한 관찰
- (3) 직장 온도를 측정을 통한 처치나 보정에 관련된 반사적 호흡완서 또는 저/고체온에 대한 보충 증거
- (4) 시험 프로토콜에 동력학, 생물 감시, 폐 기능, 폐 조직에 누적되는 잘 녹지 않는 물질의 보유, 그리고 거동 변화와 같은 추가 평가가 포함될 수 있다.

주 3) 표준 임상 병리학 파라미터

- (1) 혈액학 검사 항목 : 적혈구 수, 전체 백혈구 수, 헤마토크릿, 분화(Differential) 백혈구 수, 헤모글로빈 농도, 혈소판 수, 평균 혈구 헤모글로빈, 평균 혈구 양, 평균 혈구 헤모글로빈 농도, 망상적혈구, 응고 가능성(택1, 프로트롬빈 시간, 응고 시간, 부분 트롬보플라스틴 시간)
- (2) 생화학 검사 항목 : 글루코오스 (야간 공복 후), 총 콜레스테롤, 트리글리세라이드, 혈액 요소성 질소, 총 빌리루빈, 크레아티닌, 총 단백질, 알부민, 글로불린, 알라닌 아미노기 전이효소, 아스파르트산염 아미노기 전이효소, 알칼리 인산가수분해효소, 칼륨, 나트륨, 칼슘, 인, 염화물
- (3) 뇨 검사 항목 (선택사항) : 외관(색상 및 혼탁도), 총 단백질, 용적, 글루코오스, 비중 또는 삼투압, 혈액/혈구, pH

주 4) 시험물질의 독성의 특성화를 위해 추가 평가 항목

Cholinesterase, 지질, 호르몬, 산/염기 균형, 메트헤모글로빈(Methaemoglobin) 또는 하인츠(Heinz) 소체, Creatine kinase, 골수/적혈구 비율, 트로포닌, 동맥피 가스, lactate dehydrogenase, sorbital dehydrogenase, glutamate dehydrogenase, gamma glutamyl transpeptidase

주 5) 전체 부검 중에 보존할 기관 및 조직

- (1) 육안 병리검사 시 적절한 고정액에 고정해야 한다.
- (2) 갑상선과 부고환의 중량을 정확히 측정하기 위해 결체조직 등을 제거하다보면 이러한 과정이 병리조직학적 평가를 방해할 수 있기 때문에 필요한 경우에만 중량을 달아야 한다.
- (3) 육안 병리검사 및 장기 무게 측정이 완료된 장기 및 조직들은 가능한 부검이 수행되는 즉시, 사용할 접착제에 따라 다듬질 전에 24 시간 ~48 시간 이상, 10 % 중성 완충 포르말린액 또는 적절한 고정액에 고정시킨다.
- (4) 부검 조직 목록 : 대동맥, 골수(및/또는 새로운 흡인물), 맹장, 결장, 십이지장, 대퇴골 및 후슬관절, 담낭(존재하는 경우), 회장, 공장, 식도, 췌장, 부갑상선, 말초신

- 경(좌골 또는 경골, 근육과 가까운 쪽), 뇌하수체, 전립선, 직장, 침샘, 정낭, 피부, 척수(경부, 중간 흉부 및 요추), 흉골, 위, 치아, 기도(용골을 통한 1 개 세로 부분과 1 개 가로 부분을 포함한 최소한 2 개 단위), 방광, 후두(후두개의 바닥을 포함한 3 개 단위), 림프절(침입구로부터 먼 쪽), 유선(암컷), 근육(넓적다리), 비인두 조직(최소한 4 개 ; 1 개 은비인두관 및 비강 연관조직(NALT) 포함), 특히 잘 녹지 않는 미립자 시험물질에 대해서는 폐의 폐문 부위로부터 오는 림프절 (면역학에 집중한 더 심층 검사 및/또는 연구를 하려면, 추가 림프절, 예컨대, 종격, 경부/악하 및/또는 귀 부위로부터 오는 림프절), 표적 기관, 전체 병소 및 질량 모두
- (5) 보존을 위해 잘 다음어져야 하는 기관 및 조직 목록 : 부신, 난소, 뇌(대뇌, 소뇌 및 수질/뇌교부분 포함), 심장, 신장, 간, 폐(기관지를 포함한 모든 엽을 1 개 레벨에), 비장, 고환, 흉선, 갑상선, 자궁
- (6) 연구 지도자의 판단에 따라 보존될 수 있는 기관 및 조직 : 후각 신경구, 눈 (망막, 시신경) 및 눈꺼풀, 부고환, 하르더샘, 눈물샘(궤도외), 혀, 수뇨관, 요도
- (7) 폐는 온전하게 제거하여, 무게를 달고, 폐 조직이 유지되도록 확실히 하기 위해 20 cm ~ 30 cm의 물 압력에서 고정하고, 기관지를 포함한 모든 엽(lobes)에 대한 부분을 1 개 부위에서 수거해야 하지만, 폐 세척을 수행한다면, 세척되지 않은 엽을 3 개 부위(연속절편이 아닌)에서 절개해야 한다.
- (8) 비인두 조직의 최소한 4 개 부위를 검사해야 하며, 편평 상피, 이행 상피(무섬모 호흡기), 호흡기(섬모 호흡기) 및 후각 상피, 그리고 배수 림프 조직(NALT)을 적절히 검사할 수 있도록 하기 위해 그 중 하나에 비인두관이 포함되어야 한다. 후두의 3 개 부위를 검사해야 하며, 이 레벨 중 하나에 후두개의 바닥이 포함되어야 한다. 폐 외부 기관지의 분기 용골을 통한 1 개, 세로 부분과 1 개 가로 부분을 포함한 기도의 최소한 2 개 부위를 검사해야 한다.

제12항 최기형성시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 시험물질을 태자의 기관형성기 상태에 있는 임신동물에 투여하고, 시험물질이 태자의 발생에 미치는 장애, 특히 최기형성을 밝히는데 목적이 있다.

2. 정의

2.1 최기형성

태자 발생기동안 구조적으로나 기능적으로 영구적 이상을 초래하는 화학 물질의 성질

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1 시험동물

1.1.1 동물종

(1) 랫드 또는 마우스와 같은 설치류 및 토끼와 같은 비설치류로부터 각 1 종 이상씩을 선택한다. 동물종, 계통 및 품종의 선택은 생식능 및 차세대 시험에서와 같이 한다.

(2) 만성독성시험에서와 같은 동물종을 사용하는 경우에는 같은 계통을 사용한다.

(3) 랫드, 마우스 또는 토끼 이외의 동물종을 이용할 때는 그 지침을 본시험의 목적에 알맞게 수정할 필요가 있다.

1.1.2 동물수

랫드와 마우스는 임신된 개체의 수가 각 용량군마다 20 마리 이상, 토끼는 12 마리 이상으로 한다.

2. 시험방법

2.1 원리

시험물질을 태자의 기관형성기에 투여한 후 분만 직전에 부검하여 임신 성립여부, 황체수, 착상수를 조사하고, 내부기관을 육안적으로 관찰한다.

2.2 시험물질

2.2.1 투여방법

원칙적으로 위관투여법(Gavage)을 통해 경구투여를 한다.

2.2.2 용량

용량·반응 관계를 알고, 최대 무악영향관찰량을 측정하기 위하여, 원칙적으로 3단계 이상 용량의 시험군을 설정한다. 최고용량은 원칙적으로 모동물에 사료섭취량의 저하나 체중증가의 억제 등 약간의 독성증상을 나타내지만 10 %이상의 사망은 초래하지 않는 양으로 한다. 투여가능한 최대량(1,000 mg/kg을 한도로 한다)에 있어서도 어미동물에 독성증상이 나타나지 않는 경우는 그 양을 최고용량으로 한다. 최저용량은 태자의 발생에 독성영향이 나타나지 않는 양으로 한다. 별도로 용매만을 투여하는 대조군을 둔다.

2.2.3 투여기간

태자의 기관형성기간동안 매일 투여한다. 보통 교미 확인된 날을 임신 0 일로 했을 경우, 마우스와 랫드에서는 임신 6 일부터 16 일 까지, 토끼에서는 임신 6 일에서 18 일까지로 한다.

2.3 관찰사항

2.3.1 모동물

전 시험기간 동안에 일반상태를 관찰하고, 체중 및 사료섭취량을 측정한다. 출산 예정일의 바로 전날에 모두 부검하고, 임신성립여부, 황체수, 착상수를 조사하고, 내부기관을 육안으로 관찰한다.

2.3.2 태자

태자의 생사를 판정하고, 사망한 새끼에 대해서는 사망시기를 추정한다. 살아있는 새끼에 대해서는 체중을 측정하고 성을 판정한다. 그리고 외형 및 내부기관의 육안적 검사와 1/3 이상의 새끼에 대하여 골격검사를 한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

관찰된 이상상태나 독성증상과 시험물질의 투여량과의 관계에 대해서는 적절한 통계학적 방법을 이용하여 고찰하고, 무악영향관찰량에 대한 견해를 밝힌다. 이때, 한배에서 나온 새끼들을 표본단위로 한다.

2. 시험결과의 보고

시험보고서는 다음의 항목을 포함한다.

- 2.1 시험기관의 명칭 및 소재지
- 2.2 시험책임자 및 담당자 성명
- 2.3 시험동물: 종, 계통, 체중, 주령, 성 및 사용수
- 2.4 시험물질투여 등에 관한 독성반응자료
- 2.5 각 시험동물의 이상증후를 발견한 시간 및 이상증후
- 2.6 사료 및 체중관련자료
- 2.7 임신 및 출생동물에 관한 자료
- 2.8 태아관련자료 (사망/생존, 성, 연골 및 경골 결함여부)

제13항 2 세대 생식독성시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 생식선기능(Gonadal function), 성주기(Oestrus cycle), 교미행동(Mating behavior), 수태(Conception), 임신(Gestation), 분만, 수유, 이유, 차산자의 성장 및 발육을 포함한 수컷 및 암컷 생식계의 완전성(Integrity) 및 기능(Performance)에 대한 화학물질 및 혼합물의 영향과 관련 있는 정보를 얻는데 목적이 있다. 즉, 차산자(F1) 세대의 성장 및 발달에 대한 연구뿐만 아니라, 수컷 및 암컷 생식계의 완전성 및 기능과 차차산자(F2) 세대의 성장 및 발달에 대한 화학물질의 영향을 관찰할 수 있다.

2. 정의

2.1 생식 독성(Reproduction toxicity)

차세대에 대한 유해한 영향 또는 암수의 생식 기능 장애 혹은 능력 장애

2.2 모체 독성(Maternal toxicity)

직접 혹은 간접적으로 나타나는 수태한 암컷에 대한 부작용

2.3 번식능 장애(Impairment of fertility)

수컷 혹은 암컷의 생식 기능 혹은 능력 장애

2.4 발생 독성(Developmental toxicity)

차산자의 출생 전, 주산기 그리고 출생 후에 관찰되는 구조적 혹은 기능적 장애를 나타내는 생식 독성의 징후

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1 실험동물

시험에 사용되지 않은 건강하고 임신 경험이 없는 랫드(투여시 5 주령 ~ 9 주령)를 사용한다. 랫드 외의 실험동물을 사용할 경우 그 실험동물을 사용한 적절한 사유 및 정당성을 제시하여야 한다. 시험에 사용되는 동물들의 무게 차는 최소로 하고, 동물 개체 무게와 각 암·수의 평균 무게와의 차는 $\pm 20\%$ 이하로 한다. 모체 및 차산자 각각에 대해 고유 식별 번호를 부여하고, 각각의 F1이 출생한 한배새끼는 다른 한배새끼와 구분하여 기록한다.

1.2 사육조건

사육실은 온도가 $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, 상대습도가 $30\% \sim 70\%$ 가 유지되도록 한다. 사육은 암·수를 구별하여 실시하며 각 개체의 상태 관찰이 용이하고 밀도가 높지 않도록 한다. 조명은 명/암이 12 시간/12 시간이 되도록 조절하며, 사료와 음용수를 적절히 공급한다. 사료를 이용하여 시험물질을 투여하는 경우 시험물질이 사료에 잘 분산되도록 한다.

각 동물을 개별적으로 사육하거나 작은 동물은 성이 같은 동물군으로 사육할 수 있지만 수태한 암컷은 케이지당 한 마리씩 사육한다. 그 밖의 동물실 환경조건은 일반적인 환경기준에 따른다.

1.3 시험물질 및 투여

위관투여법으로 경구 투여, 혹은 사료, 음용수를 통해 시험물질을 투여할 수도 있다. 다른 경로를 통해 투여할 경우 경로설정에 대한 정당성을 제시한다. 경구 투여의 경우 매일 같은 시간에 투여하고, 동물의 체중당 일정한 양으로 투여하기 위해 적어도 1 주일에 한 번은 각 실험동물의 체중을 측정하여야 한다. 이유기 동물은 수유를 통해 시험물질이 간접적으로 투여되고, 사료/음용수를 사용하는 경우 수유가 끝나는 마지막 주에 직접적으로 투여된다.

시험 물질의 최대 1 회 경구 투여량은 수용액의 경우 $2\text{ mL}/100\text{ g}$ (체중), 비수용액의 경우 $1\text{ mL}/100\text{ g}$ (체중), 옥수수기름의 경우 $0.4\text{ mL}/100\text{ g}$ (체중)를 초과하면 안 된다. 사료 혹은 음용수 를 통해 투여되는 경우 동물의 체중 당 일정한 투여량을 적용한다.

1.4 시험군의 구성 및 투여용량 설정

최소 3 개의 투여군과 1 개의 대조군으로 각 군당 암수 각각 20 마리 이상(수태한 암컷의 최소수는 20 마리)로 구성한다.

투여농도 설정은 급성 독성 시험 혹은 반복 투여독성 시험 결과, 그리고 시험물질 혹은 관련 있는 물질에 유용한 모든 독성 및 역학 자료를 고려한 후 투여농도를 결정한다. 독성 영향은 유발하지만 죽거나 심한 고통은 주지 않는 농도를 최대 투여농도로 선택해야 한다. 가능한 2 배 ~ 4 배의 공비를 두고(사료에 섞어 투여할 경우 3 배 이하), 투여농도를 줄이는 것이 이상적이다. 용량간격이 대단히 큰 경우(즉, 공비가 10 이상), 최저용량 시험군을 하나 더 둔다. 시험 물질을 투여할 때 용매를 사용하는 경우, 사용된 최대용량의 용매를 대조군에게 투여한다. 경구로 1 회 투여농도가 최소 1,000 mg/kg(체중)/day이거나 동일한 양의 시험물질을 사료 혹은 음용수에 첨가·투여하여 어떠한 독성 영향도 발견할 수 없거나, 구조적으로 관련 있는 화합물에서 얻은 자료를 근거해 독성이 발견되지 않는 경우에는 한계시험을 수행할 수 있다.

2. 시험방법

2.1 원리

수컷(P)은 성장 기간 및 최소한 한 번의 완전한 정자 형성 주기(마우스의 경우 약 56 일, 랫드의 경우 약 70 일 이상) 동안 투여하고, 암컷(P)은 성장기간 및 완전한 생식주기(임신시기, 임신기간 및 F1의 수유기 포함)동안 단계적 용량의 시험물질을 각 군에 투여한다. F1의 경우 이유기, 성장기, 성체기 및 교미기를 거쳐 F2의 수유기에 이를 때까지 시험 물질을 매일 투여한다. 이 시험을 통해 수태부터 F1 및 F2의 성장 및 발생, 수태능, 번식능, 모체 및 수유 행동에 대해 예상되는 시험물질의 영향을 관찰할 수 있다. 기존 독성정보가 있는 경우 그 자료를 바탕으로 시험물질 투여 및 관찰 일정을 변경하여 수행할 수도 있다.

수컷의 경우, 2 주간의 교미기가 지나고 생식 영향에 대해 더 이상 평가할 필요가 없다면 안락사 후 영향을 관찰한다.

2.2 교미

모체(P)는 최소 5 일 동안 순화 후, 교미시기 2 주 후까지 수컷과 암컷을 같이 사육하고 일반적으로 암수 1 : 1로 진행한다. 정자 혹은 질전(Vaginal plug)이 관찰되면 임신 0 일로 정의한다.

F2를 생산하기 위해서, 같은 용량 투여군의 다른 한배새끼 중 암수인 F1을 각각 선택하여 교미시킨다. 교미용 F1의 경우 몸무게 및 외관적 관찰로 판단하여 성숙 동물 선택한다.

수태하지 못한 암수의 경우 추가교미, 생식기관의 미시적 조사, 발정주기 또는 정자형성 등 여러 결과를 바탕으로 불임의 원인을 조사한다. 시험물질로 인한 한배새끼의 크기 및 영향이 모호한 경우, P 또는 F1 성체를 다시 교미시켜, 두 번째 한배새끼를 생산하여 관찰한다. 이때 교미시키지 않은 한배새끼의 다른성을 사용한다. 한배새끼는 이 유기까지 모체와 함께 사육하고 한배새끼의 크기 측정은 선택사항이다.

2.3 관찰사항

시험 기간 동안 적어도 하루에 한번 같은 시간에 임상증상을 관찰하고, 독성 징후가 관찰됐을 때는 더 자주 관찰해야 한다. 행동 변화, 분만이 어렵거나 지연되는 징후, 폐사를 포함한 모든 독성 징후를 시간 및 기간을 포함하여 기록한다. 그리고 1 주일에 한번 각 동물에 대해 체중측정과 병행하여 상세한 임상증상을 관찰한다. 임신 0 일부터 계산된 수태기간을 계산하고, 분만 후 24 시간(분만 후 0 일 혹은 1 일) 및 분만 4 일 후 생존한 F1, 사망한 F1, 작은 F1 수 및 성별을 조사하고 체중 및 어미와 F 모두 이상행동을 기록한다.

2.3.1 체중 및 사료/음용수 섭취량

투여 첫날, 수컷과 암컷의 체중을 측정한 후, 시험이 끝날 때까지, 적어도 1 주일에 한번 모체동물(P 및 F1)의 체중을 측정한다. 임신 0 일, 7 일, 14 일, 20 일 또는 21 일 후와, 수유기 중 한배새끼의 몸무게를 측정하는 날 그리고 동물이 폐사한 날에 모체 암컷(P 및 F1)의 체중을 측정한다. 사료 섭취량은 교미 후, 임신기간, 수유 기간 동안 적어도 1주일에 한번 측정하고 시험물질이 음용수를 통해 투

여되는 경우 이 기간 동안 음용수 섭취량도 측정해야 한다.

2.3.2 정자 관찰지표

시험 종료시 모든 P 및 F1 수컷의 고환 및 부고환 무게를 기록하고, 조직 병리학적 검사를 위해 모든 기관을 고정시킨다. 각 P 및 F1 수컷 동물군 중, 최소한 수컷 10 마리의 고환을 균질화 시킨 정세포와 꼬리 부고환의 정자를 사용하여 시험한다. 시험물질의 노출과 관련 있는 영향이 관찰되거나, 정자 형성에 대해 예상되는 영향에 관한 자료가 있는 경우, 각 투여군의 모든 수컷에 대해 정자 평가를 실시한다. 그렇지 않은 경우 대조군과 고용량 투여군의 P 및 F1 수컷 정자에 대해서만 관찰해도 무방하지만 고용량 투여군에서 시험물질과 관련된 영향이 관찰되었다면 저용량 투여군도 분석해야 한다.

부고환(또는 정관) 정자를 이용하여 형태학적 평가를 실시한다. 정자(최소한 샘플당 200 마리)를 습윤법으로 고정시킨 후 정상 혹은 비정상으로 분류한다. 융합, 두부(Head)의 소실, 두부기형 및/또는 기형꼬리는 부고환 정자 형태학적 이상의 현상이다. 정자검사는 부검 후 즉시 수행하거나 비디오나 디지털 기록에 의한 컴퓨터 정보처리 결과를 근거하여 수행할 수 있다.

2.3.3 차산자/차차산자

분만(수유 0 일째)된 후 바로 각 한배새끼의 수, 성별, 사산한 수, 정상 분만된 수 및 성별, 이상 F1의 수를 기록한다. 수유 0 일째 폐사한 F1는 사산원인을 파악하여 보관하고, 생존한 개체는 체중을 측정한다. 이후 수유 4 일째, 7 일째, 14 일째, 21 일째 체중을 측정하고 모든 동물의 이상증상을 관찰하고 기록한다. 몸무게 증가에 따른 차산자의 성숙(질개구 또는 귀두포피 분리)과 기능검사(운동, 감각기능 및 반사적 발생)관련 결과를 함께 평가한다. F1의 성 비율 혹은 성적 성숙도 시기에 변화가 시작되는 경우, 출생 0 일째 F2의 생식기와 항문 사이의 거리를 측정한다.

2.3.4 장기무게 측정

시험 종료시 다음의 모든 P 및 F1 모체 동물의 장기무게를 측정한다.

- 자궁, 난소, 고환, 부고환(전체 및 미부), 전립선/응고샘/체액, 정낭, 뇌, 간, 신장, 비장, 뇌하수체, 갑상선, 부신, 등

시험 종료 후, 육안적 관찰이 끝난 F1 및 F2 차산자의 몸무게를 측정한 후, 무작위로 선

택한 한 개체의 F1/성별/한배새끼의 뇌, 비장, 흉선의 무게를 측정한다.

2.3.5 조직 병리학적 관찰

시험 종료시 또는 시험 기간 중 폐사한 개체는 모두 구조적 이상 혹은 병리학적 변화에 대해 육안으로 관찰하고 다음의 절차에 따라 조직병리학 검사를 실시한다.

2.3.5.1 모체 동물

모체 동물(P 및 F1)의 생식기관 중 암컷의 경우 질, 자궁경부를 포함한 자궁, 난소를, 수컷의 경우 한쪽 고환(Bouin 고정제 사용), 한쪽 부고환, 정낭, 전립선, 응고샘을 고정한다. 교미용으로 사용된 P 및 F1 동물의 알려진 표적장기도 고정한다.

교미용으로 사용된 모든 용량 투여군 및 대조군의 P 및 F1 동물은 고정된 모든 기관에 조직병리학적 검사를 수행하여 무악영향관찰량(NOEL)을 결정한다. 시험물질 노출과 관련된 영향을 확인하기 위해, 고환에 대해 상세한 조직 병리학적 시험을 수행하고, 이때 종단면 평가를 할 수 있는 두부, 몸체, 및 미부가 손상되지 않은 부고환을 사용한다. 그 외 백혈구 침입, 세포 형태 및 변종 세포 형태의 변화, 정자의 식균 작용을 확인하고 Periodic acid-schiff(PAS) 및 헤마톡실린 염색약을 사용해, 수컷의 생식 기관을 분석한다.

수유 후 난소는 초기(Primordial) 및 생성 난포뿐만 아니라, 수유기 황체를 포함하고 있어 조직병리학적 검사를 통해 초기 난포군의 질적 감소를 확인한다. F1 암컷의 초기 난포군에 대한 작은 생장 난포군을 포함한 초기 난포군의 수를 측정하는 정량 분석도 수행한다.

2.3.5.1 이유기의 차산자

외관상 비정상 혹은 임상적 징후를 보이는 모든 차산자의 모든 비정상적인 조직 및 표적장기뿐만 아니라, 최소한 F1 및 F2에서 무작위로 선택한 한 개체의 F1/성별/한배새끼(교미용 제외)를 고정시킨 후, 조직 병리학적 검사를 실시한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

시험 시작 시 각 시험군과 각 세대의 동물 수, 시험 기간 동안 사망하거나 인도적으로 치사시킨 동물의 수와 그 시기, 수정한 동물의 수, 수태한 암컷의 수, 독성 징후를 보이는 동물의 수, 모든 독성 영향의 시작 및 기간 및 심각도를 포함한 관찰된 독성 징후에 대한 설명, 조직 병리학적 변화의 형태, 관련된 모든 한배 새끼에 관한 데이터가 개재된 표로 작성해 요약한다. 신뢰성 있는 통계 방법을 사용해 결과를 정량 분석한다. 데이터 분석을 위해, 용량-반응 통계 모델을 사용할 수 있으며 충분한 분석 방법과 사용한 컴퓨터 프로그램 정보를 시험보고에 포함한다.

2. 결과의 평가

시험물질 투여군과 대조군과의 관계, 이상의 발생 및 심각성뿐만 아니라, 전체적 이상 영향, 확인된 표적기관, 불임, 임상증상, 영향 받은 생식 및 수태 능력 및 한배새끼의 행동, 체중 변화, 폐사에 대한 영향, 기타 모든 독성 영향이 평가에 포함된다. 또한 시험물질의 생식독성관련 무악영향관찰량(NOAEL)과 성장 및 성적 성숙을 포함한 생식, 분만, 수유, 출생 후 발육의 부작용에 관한 결과를 평가한다.

3. 시험결과의 보고

시험보고는 다음의 항목을 포함한다.

3.1 시험기관의 명칭 및 소재지

3.2 시험책임자 및 담당자 성명

3.3 시험물질

- IUPAC 또는 CAS 번호와 같은 화학물질명
- 시험물질의 순도 또는 실험용 혼합물(무게 %로 나타냄)의 배합, 물리적 특성 및 순도
- 시험의 수행과 관련된 시험물질의 물리적 상태(기체, 고체, 액체 등), pH, 안정

성, 수용해도, 물리화학적 성상

- 물이 아닌 용매를 사용하였을 때, 선택 이유에 대한 적정성

3.4 시험동물

- 사용된 종/계통
- 동물의 수, 주령, 성별
- 사육조건, 시험을 시작할 때, 각 동물의 체중

3.5 시험조건

- 용량 선택에 대한 이유
- 시험 물질 배합/사료 제조에 대한 상세한 설명, 결정 농도, 배합과 제조의 안정성 및 균질성
- 시험 물질 투여에 대한 상세한 설명
- 섭취된 사료/음용수에 포함된 시험 물질 농도를 실제 투여량(mg/kg/day)으로 전환
- 사료 및 음용수 관련 상세한 설명

3.6 시험결과

- 사료 및 음용수 섭취량
- 사료효율(체중증가량/사료섭취량), P와 F1의 시험물질 섭취량(교배기 및 수유기의 마지막 3 일 제외)(권장사항)
- 시험물질의 흡수관련 자료(권장사항)
- 교미용으로 사용된 P 및 F1의 체중
- 한배새끼 및 F1 체중
- 부검시 체중 및 모체/부체 동물의 절대/상대 장기 중량
- 임상 관찰의 특성, 심각성, 기간
- 시험 기간 동안 시험동물이 폐사한 시기 혹은 생존한 동물의 부검시기
- 번식력, 수태, 기타 모든 독성 징후를 포함한 성 및 투여별 독성 반응 데이터
- 생식, F1, 출생 후 성장 등에 대한 독성 혹은 다른 영향
- 부검시 육안적 관찰 결과

- 모든 장기의 조직 병리학적 검사 관찰 결과
- P 및 F1 암컷의 일반적인 배란 주기 횟수 및 주기 기간
- 부고환 꼬리에 있는 정자의 총수, 직진 운동하는 정자의 비율, 형태학적으로 정상인 정자의 비율, 비정상인 정자의 비율
- 교미할 때까지의 일수를 포함한 교미 기간
- 수태기간
- 착상한 태자 수, 황체의 수, 한배 새끼 크기 및 체중
- 생존한 F1 및 착상 후 죽은 태자 수
- 관찰된 전체적인 이상을 가진 F1 수, 작은 F1 수
- F1의 신체적 경계표(Physical landmark), 다른 출생 후 발육 자료, 평가된 신체적 경계표에 대한 정당성
- 적용 가능한 새끼 및 성체에 대한 기능적 관찰 자료
- 결과에 대한 적절한 통계 방법
- 모성 행동 및 F1에 미치는 영향에 대한 무악영향관찰량을 포함한 결론

3.7 결과의 고찰 및 결론

제14항 독성동태시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 화학물질의 흡수, 분포, 배설 및 대사에 관한 독성동태학 (Toxicokinetics)적 연구로부터 얻은 정보를 토대로 독성을 평가하고 해석하는 것을 목적으로 한다.

2. 정의

2.1. 독성동태학 (Toxicokinetics)

물질의 흡수, 분포, 대사 및 배설에 관한 연구

2.2. 흡수 (Absorption)

투여물질이 체내에 들어오는 과정

2.3. 분포 (Distribution)

흡수물질 및 그 대사체가 체내에서 순환하고 분산되는 과정

2.4. 대사 (Metabolism)

투여물질이 효소 및 비효소 반응을 통하여 체내에서 구조적으로 변화하는 과정

2.5. 배설 (Excretion)

투여물질 및 그 대사체가 체외로 제거되는 과정

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1. 시험동물

건강한 동물 성체를 시험 전 5 일 이상 시험조건에서 순화시킨다. 시험에 사용되는 동물은 무작위로 선정한다. 미성숙 개체 또는 임신한 개체를 사용할 경우에는 시험의 목적과 특별한 사유를 제시하여야 한다.

1.1.1. 시험종의 선택

하나 또는 그 이상의 동물 종을 시험에 사용할 수 있다. 동일한 시험물질에 대해 다른 독성 연구에서 사용되거나 사용이 권유되는 시험 종을 선택하는 것이 바람직하다. 설치류를 시험에 사용하는 경우, 개체별 체중이 평균 체중의 $\pm 20\%$ 를 초과하지 않도록 한다.

1.1.2. 수량 및 성별

1.1.2.1. 흡수 및 배설 연구를 위해서는 대조군 및 각 처리군에 대해 최소 4 마리로 시작한다. 시험에 사용되는 성별은 정해져 있지 않으나, 성별을 구분해서 시험해야 할 특별한 경우에는 한쪽 성만을 구분해서 노출할 수 있다. 성별에 따른 반응의 차이가 인정될 때는 암수 모두를 사용하여야 한다. 이때 각 성별로 처리군당 4 마리 이상을 사용한다. 비설치류의 경우에는 처리군당 4 마리 이하로 할 수 있다.

1.1.2.2. 조직내 분포를 연구하는 경우, 대조군 및 처리군에서의 최초 시험개체수는 시험과정에서 관찰하는 시점의 횟수와 각 시점에 관찰하는 동물의 수를 고려하여 결정한다.

1.1.2.3. 대사를 연구하는 경우, 개체 수는 실험의 목적에 따라 시험자가 적절하게 결정한다.

1.1.2.4. 시험물질을 반복적으로 노출시키거나 여러 시점에서 관찰하는 시험의 경우, 관찰시점의 횟수 및 관찰을 계획한 동물의 수 등을 고려하여 처리군의 개체 수를 결정한다. 그러나 최소한 2 마리 이상 사용하도록 한다.

1.1.3. 사육 및 사료 조건

1.1.3.1. 실험동물실의 온도는 $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대습도는 $30\% \sim 70\%$ 를 유지하도록 한다.

1.1.3.2. 실험동물들은 적절한 케이지에 사육한다(시험목적에 따라 필요한 경우 대사케이지에 사육한다).

1.1.3.3. 조명은 하루 12 시간(명)/12 시간(암) 조건을 둔다.

1.1.3.4. 설치류의 경우, 사육과정에서는 음용수를 자유롭게 섭취시키고, 먹이는 일반적인 실험용 사료를 제공한다. 비설치류의 경우, 해당 동물에 적절한 사육조건에 따라 사육한다. 어떠한 사료를 제공하더라도 사료의 성분에 대한 정보를 확보해야 하며, 사료 조성은 시험물질의 성분에 영향을 주지 않아야 한다.

2. 시험방법

2.1. 원리

시험물질은 적절한 경로를 통하여 체내에 투여하며, 목적에 따라 처리군에 일회 또는 반복적으로 투여한다. 물질 투여 후, 체액, 조직 또는 배설물에서의 해당 시험물질 또는 시험물질의 대사체를 분석한다.

2.2. 시험물질

시험물질이 식별되도록 표지하거나 표지하지 않는 방식으로 노출시킬 수 있다. 방사능 동위원소를 써서 식별하는 경우, 시험물질의 거동에 대한 정보가 제공될 수 있도록 동위원소를 시험물질에 표지하도록 한다.

2.3. 투여방법

2.3.1. 투여는 해당물질을 대상으로 한 다른 독성시험에서와 동일한 투여경로를 선택하고, 또한 다른 시험에서와 동일한 용매를 사용하는 좋다. 위관투여법 또는 사료에 시험물질을 섞어서 경구 투여하는 방법을 일반적으로 사용한다.

2.3.2. 위관투여법 또는 사료에 시험물질을 섞어 투여하는 경우에 흡수율 차이를 고려하여 투여한다. 투여되는 시험물질의 양을 정확히 계산하도록 한다.

2.3.3. 경구투여 외에도 일정 기간 동안 실험동물의 피부에 바르는 피부노출 또는 흡입을 통한 노출을 통해 시험물질을 투여할 수 있다.

2.3.4. 시험물질 투여 직후의 흡수 및 분포 양상을 확인하기 위해서 해당 물질을 정맥으로 주사하는 방법을 사용할 수 있다.

2.3.5. 시험물질 용매는 시험물질의 영향을 방해하지 않도록 선정한다.

2.4. 용량

단회투여를 실시하는 경우, 최소한 두개 이상의 처리군 농도를 두도록 한다. 이때 독성이 나타나지 않는 농도를 저농도로 하고, 독성동태학 매개변수에 변화를 가져오거나 독성영향이 나타날 수 있는 농도를 고농도로 설정하도록 한다. 반복투여를 실시하는 경우에는 저농도만을 설정하여 수행할 수 있으나, 필요한 경우 고농도를 추가로 설정하여 시험한다.

2.5. 시험의 실시

동물의 무게를 측정한 후, 다음의 흡수, 분포, 배설 및 대사 등의 시험목적에 맞게 시험 물질을 투여한다.

2.5.1. 흡수

투여한 시험물질의 흡수율과 흡수량을 다음과 같이 다양한 방법으로 결정할 수 있다. 이때 투여경로, 흡수율 및 흡수량이 검증된 물질을 대상으로 한 대조군을 설정, 이와 비교하여 결정할 수 있다.

- (1) 배설물(소변, 담즙, 대변, 호기) 또는 사체에 잔류하는 시험물질 또는 대사체량 측정
- (2) 처리군 및 대조군 (필요시 양성대조군 포함) 간의 생물학적 반응(예, 급성 독성시험) 비교
- (3) 처리군과 대조군에서의 신장을 통한 시험물질 및 대사체의 배출량 비교
- (4) 처리군과 대조군에서의 시험물질 또는 대사체의 혈장치와 시간곡선 내의 면적 계산값에 대한 상호비교

2.5.2. 분포

시험 물질의 분포 양상을 분석하기 위해 다음의 두 가지 모두 또는 두 가지 중 하나의 접근방법을 사용한다.

- (1) 전신 방사선 촬영술을 이용하여 유용한 정량적 정보를 획득
- (2) 시험물질 노출 후, 시간별로 동물을 부검하여 각 장기 및 조직에서의 시험 물질 또는 대사체의 농도와 양을 확인함으로써 정량적 정보를 획득

2.5.3. 배설

- (1) 배설 연구에서는 소변, 대변 및 호기, 경우에 따라 답즙을 채취한다. 이러한 배설물에서의 시험물질 또는 대사체의 양은 노출 후 수차례 측정하도록 한다. 측정 횟수는 시험물질 노출 후 투여된 물질의 약 95 %가 배출될 때까지 또는 투여 후 7 일 동안 수차례 측정한다.
- (2) 수유기의 실험동물을 사용하는 것과 같은 특별한 경우, 실험동물의 모유에서 배출되는 시험물질의 배출량을 측정할 수 있다.

2.5.4. 대사

- (1) 대사연구를 통한 대사체 구조의 확인시험은 대사경로 및 과거시험에서의 의문점에 대한 해답을 구하기 위하여 수행한다.
- (2) 대사경로에 대한 정보를 얻기 위해서는 시험관 내 시험(*In vitro* test)을 추가로 실시할 수 있으며, 보다 정확한 대사정보를 습득하기 위하여 독성 및 생화학적 연구를 수행할 수 있다(예를 들어, 대사효소체계에 대한 효과, 내인성 비단백질성 - SH 화합물의 고갈 및 고분자와의 결합 등).

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리 및 평가

1.1. 결과의 처리

대조군 및 각 처리군에 대해 시간, 농도, 조직, 기관(장기) 등과 관련된 측정치의 평균 및 통계적 변이값을 산출하여 표시한다. 가능한 경우, 데이터를 표로 작성하고, 필요하면 그래프를 추가한다. 흡수 정도 및 배설량, 배설 속도는 적절한 방법을 통하여 계산한다. 대사연구의 경우, 대사체의 구조를 확인하고 대사 경로를 표시한다.

1.2. 결과의 평가

1.2.1. 흡수

시험물질의 흡수에 대한 연구 결과는 급성독성을 평가하거나 반복투여독성 연구를 위한 시험 계획에 도움을 줄 수 있다. 시험 물질이 흡수되지 않거나 급성독성을 나타내지 않는다면(예, 폴리머 종류), 더 이상 반복투여 연구가 필요하지 않음을 제안할 수 있다.

1.2.2. 분포

조직 및 기관(장기)에 대한 시험물질의 분포양상을 확인함으로써 반복투여독성에 대한 연구 및 평가에 도움을 제공할 수 있다. 임신동물에 대한 분포조사를 통해 기관형성기의 임신모체에 노출된 시험물질이 태반을 어느 시점에서 어느 정도 통과하는지 측정할 수 있다. 또한 분포 연구의 시험데이터를 통하여 시험물질이 신체의 어느 조직 또는 기관(장기)에 축적되는지를 확인할 수 있다.

1.2.3. 배설

시험물질의 배설 양상을 확인함으로써 반복투여 연구 및 평가에 도움을 제공할 수 있다. 배설량 및 배설 속도를 평가함으로써 시험물질 또는 대사체가 체내에 잔류하는지 여부를 조사할 수 있다. 시험물질 또는 대사체의 잔류 여부는 독성반응의 변화와 관련을 보일 수 있다.

1.2.4. 대사

1.2.4.1. 시험 물질의 대사 양상 및 대사 속도를 확인함으로써, 해당 물질의 만성독성 연구결과를 해석하는데 도움을 줄 수 있다. 이와 같은 연구를 통해 투여량 범위에서 독성대사 매개변수에 어떠한 변화가 나타나는지에 대한 확인이 가능하다. 만성독성시험을 위한 시험물질의 용량 선정 시 용량의존적 대사 반응에 대한 정보를 토대로 이루어질 수 있다.

1.2.4.2. 반복투여 조건의 독성반응에서 확인된 변화들은 대사효소의 유도과 관련될 가능성이 있다.

1.2.4.3. 동위원소 표지를 통해 식별 가능한 시험물질의 투여 후, 고분자 물질과 결합한 동위원소량을 검출함으로써 중간대사체 또는 반응 중간산물에 대한 정보를 얻을 수 있다.

1.2.4.4. 시험물질이 체내 -SH 화합물을 고갈시키는 지 여부가 확인되는 경우, 독성영

향이 체내에서 활성화된 대사체에 의한 것인지 여부를 평가하는데 도움을 제공할 수 있다. 또한 이는 반복투여 연구를 위한 용량 설정에 활용될 수 있다.

2. 시험결과의 보고

수행된 독성동태 시험의 종류에 따라 결과보고서는 다음과 같은 정보를 포함하도록 한다.

- 2.1. 동물의 종과 계통 및 개체수
- 2.2. 방사능 동위원소로 표지한 경우 표지된 시험물질 특성 또는 대조물질의 특성
- 2.3. 용량 및 투여 간격
- 2.4. 투여 경로 및 사용된 용매
- 2.5. 사료
- 2.6. 생물학적 시료(호흡으로 배출된 공기 포함)에서 시험물질 또는 대사체 확인 방법
- 2.7. 실험동물의 성별, 용량 투여 계획, 시간, 조직, 기관(장기)에 대한 측정치를 포함한 도표
- 2.8. 시간별 흡수속도 및 배설 속도
- 2.9. 생물학적 시료에서의 대사체 확인 방법
- 2.10. 대사와 관련된 생화학적 분석 방법
- 2.11. 예상되는 대사 경로
- 2.12. 다음의 정보 또는 과정을 토대로 시험결과에 대한 해석과 고찰을 실시한다.
 - (1) 시험물질의 흡수에 관한 정보를 토대로 경구, 피부, 흡입 및 기타 경로를 통해 실험동물 체내로 도입되는 물질의 양 및 속도를 평가한다.
 - (2) 시험물질의 분포에 관한 정보를 토대로 실험동물의 각종 조직 및 장기에서 흡수된 시험물질 또는 대사체가 순환하고 분포하는 양상을 평가한다.
 - (3) 시험물질의 배설에 관한 정보를 토대로 동물 체내에서 투여된 시험물질 또는 대사체가 제거되는 속도와 양을 평가한다.
 - (4) 시험물질의 대사에 관한 정보를 토대로 투여된 시험물질 또는 대사체가 효소 및 비효소 반응을 거쳐 구조적으로 어떻게 변하는지를 평가한다.

제15항 급성 경구독성시험(고정용량법)

I. 개요

1. 목적

이 시험은 시험동물의 보호를 위해 치사량 이상의 화학물질 사용을 가급적 피하고, 치사량 이하의 용량에서 경구 투여하여 독성증상을 관찰하는데 목적을 둔다.

2. 정의

2.1. 급성경구독성

시험물질을 24 시간 이내에 1 회 또는 수회 경구투여한 후 단시간 내에 나타나는 악영향(Adverse effects)

2.2. 용량(Dose)

투여하는 시험물질의 양. 일반적으로 단위는 시험동물의 체중 당 시험물질의 무게(예, mg/kg)로 표시한다.

2.3. 빈사 상태(Moribund state)

시험물질의 독성에 의하여 시험동물이 죽어가는 상태 또는 생존할 가망이 없는 상태

2.4. 지연사망(Delayed death)

시험물질 투여 후 48 시간 이내에 사망 또는 빈사상태에 도달하지는 않으나 그 후 14 일간의 관찰기간 동안 사망하는 경우

2.5. GHS (Globally harmonized classification system for chemical substances and mixtures)

국제적으로 조화된 화학물질 및 혼합물의 분류 체계

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1. 시험동물

연령이 8 주령 ~ 12 주령 된 시험용 랫드(다른 설치류도 가능)를 사용하며 개체 간 체중 차이는 평균체중의 $\pm 20\%$ 를 넘지 않도록 한다. 시험은 한쪽 성을 사용하는데 암컷을 사용하는 것을 원칙으로 하며, 수컷을 사용할 경우 타당한 사유를 제시한다. 암컷은 분만경험이 없고 현재 임신 중이지 않은 것을 사용한다. 시험에 사용할 개체는 시험 시작 전 최소 5 일 이상 실험실에서 순화시킨 건강한 동물 중에서 무작위로 선정한다.

1.2. 사육조건

사육실은 온도가 $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, 습도가 $30\% \sim 70\%$ 가 유지되도록 한다. 사육은 암·수를 구별하여 실시하며 각 개체의 상태 관찰이 용이하도록 밀도가 높지 않도록 한다. 조명은 명/암이 12 시간/12 시간이 되도록 조절하며, 사료와 음용수를 적절히 공급한다.

1.3. 시험물질

시험물질은 적당한 용매에 용해 또는 현탁시킨다. 시험물질은 수용성 액이 우선적으로 권장되나, 비수용성인 물질의 경우 오일(예, 옥수수기름) 또는 기타 다른 용매를 사용한다. 이때 사용하는 용매는 사전에 독성 여부와 특성이 잘 알려진 것을 사용한다.

2. 시험방법

2.1. 원리

예비시험에서 한쪽 성(암컷을 원칙으로 함)에 대해 여러 시험용량의 독성효과를 조사하고 그 결과로부터 최소 치사량 및 용량-반응 관계를 확보한다. 본시험에서는 한쪽 성(암컷을 원칙으로 함)의 동물을 사용하여 고정용량(5 mg/kg , 50

mg/kg, 300 mg/kg, 2,000 mg/kg)에 대해 단계적으로 시험한다. 시작 용량은 예비시험 결과에 근거하여 선정하는데 사망과 같은 심각한 독성을 유발하지 않으나 그 외의 독성 증상이 관찰될 수 있을 것으로 예측되는 용량으로 한다. 시작 용량의 경과에 따라 다음 용량을 결정한 후 단계적으로 투여한다.

2.2. 시험물질의 투여

2.2.1. 경구 투여하는 시험물질의 양은 시험동물의 크기에 따라 다르나, 일반적으로 최대 1 mL/100 g을 넘지 않도록 한다. 다만 수용액의 경우는 2 mL/100 g까지 허용한다.

2.2.2. 투여는 1 회 투여를 원칙으로 하되 불가능할 경우 소량씩 나누어 실시한다. 이때 투여 간격은 24 시간이 넘지 않도록 한다.

2.2.3. 시험물질 투여 전날 저녁부터 먹이 공급을 중단하고 체중을 측정한다(마우스의 경우 시험물질 투여 3 시간 ~ 4 시간 전부터 먹이공급을 중단한다). 시험물질은 절식 후 투여 당일 측정된 체중을 기준으로 경구투여한다. 경구투여 후 3 시간 ~ 4 시간 후(마우스의 경우는 1 시간 ~ 2시간 후)부터 먹이를 공급한다. 시험물질을 소량씩 나누어 투여할 경우, 투여 간격을 고려하여 소량씩 여러 번 음용수와 사료를 적절히 제공한다.

2.3. 예비시험

2.3.1. 시험물질 투여 후 적어도 14 일 동안 관찰한다.

2.3.2. 예비시험의 시작 용량은 독성 증상을 관찰할 수 있을 것으로 예측되는 용량으로써 고정용량(5 mg/kg, 50 mg/kg, 300 mg/kg, 2,000 mg/kg) 가운데 하나를 선택하여 한 마리씩 투여하고, 이때 나타난 결과를 통해 다른 농도에서 예비시험을 실시하거나 본 시험의 농도를 설정한다. 예비시험의 농도 선정은 시험물질 또는 시험물질과 관련이 있는 물질의 독성자료를 바탕으로 한다.

2.3.3. 시작 용량을 선정하기 위해서 해당 물질 또는 유사 물질의 독성정보가 없는 경우 처음에 300 mg/kg 용량으로 시작한다.

2.3.4. 만일 2,000 mg/kg 이상의 농도에서 실험동물이 사망하지 않는 경우 예비시험

을 중단하고 본시험을 2,000 mg/kg에서 실시한다.

만일, 최소 고정용량인 5 mg/kg에서 처음 투여한 1 마리의 동물이 사망하면 시험을 중단하고 GHS 카테고리 1로 분류한다. 이때 이를 확실히 검증하려면 보완적인 시험도 실시하는데 이는 시험자가 선택적으로 실시한다. 보완시험의 경우 두 번째 동물에 5 mg/kg을 투여하며, 이때 동물이 사망하면 GHS 카테고리 1 분류를 확정한다. 만약 생존할 경우 추가로 1 마리씩 일정한 시간 간격(앞서 투여한 동물의 생존이 확인된 후)을 두고 총 3 마리를 5 mg/kg 용량으로 투여한다. 이때 2 마리 이상 사망할 경우 GHS 카테고리 1로 분류하며, 1 마리 이하 사망 시 카테고리 2로 분류한다(그림 1 참조).

2.3.5. 동물복지를 위하여 5,000 mg/kg 고정용량시험은 권장되고 있지 않으나 필요하다고 판단될 때는 특별히 5,000 mg/kg 고정용량 시험을 수행할 수 있는데 이 때에는 적정 사유를 언급하여야 한다.

2.4. 본시험

2.4.1. 각 시험용량에 대해 한쪽 성(암컷을 원칙으로 함) 5 마리를 시험동물로 사용한다. 이때 예비시험에 사용된 동물 1 마리를 5 마리에 포함시켜 결과를 산출하도록 한다(예비투여에서의 투여 용량이 본시험과 다른 경우는 제외).

2.4.2. 예비시험의 결과를 토대로 설정한 용량을 시험동물에 투여하며 이때 나타난 독성반응에 따라 카테고리를 분류한다.

2.4.3. 관찰기간은 보통 14 일정도 실시하는데 관찰기간은 고정적이지는 않으며 독성반응, 속도, 회복기간 등에 따라 변경될 수 있다.

2.4.4. 관찰은 투여 후 30 분 이내에 적어도 한번 관찰하고, 24 시간 마다 주기적으로 관찰을 실시한다. 특히 투여 후 처음 4 시간은 특별한 주의를 기울여 관찰하도록 한다.

2.4.5. 관찰기간 동안 시험물질의 용량별 투여 주기는 독성증상에 따라 시험자가 선택할 수 있으나 보통 3 일 ~ 4 일 주기의 투여를 권장 한다.

2.4.6. 한계시험은 시험물질이 무독성일 가능성이 있을 때 수행될 수 있다. 2,000

mg/kg(특별한 경우 5,000 mg/kg)으로 시작되는 예비시험을 거친 후 동일 용량으로 추가 4 마리에 대해서 본 시험의 절차에 따라 수행한다(그림 2 참조).

2.4.7. 독성 증상이 나타나기 시작한 시간과 소멸되기 시작한 시간은 매우 중요하므로 모든 관찰은 체계적으로 기록되어야 하며, 개체별로 기록이 되도록 해야 한다.

2.4.8. 관찰은 피부 및 털, 눈 및 점막, 호흡계, 순환계, 자율 및 중추신경계, 행동 유형을 포함한다. 특히 경련, 설사, 유연, 혼수상태 등의 증상은 유의하여 관찰한다.

2.4.9. 체중은 시험물질 투여 직전과 종료 후 부검 직전 측정하며, 시험기간 중에는 주 1 회 측정을 원칙으로 하는데 이때 체중 변화를 계산하여 반드시 기록하도록 한다. 시험 중 사망 및 빈사동물을 포함하여 모든 시험동물은 부검 후 소견을 기록한다.

2.5. 시험상의 유의사항

2.5.1. 부식성이나 자극성이 큰 물질의 경우 시험동물에 고통을 주므로 되도록 시험을 피하도록 한다.

2.5.2. 예비시험에서 가능한 5 마리 이상의 시험동물은 사용하지 않도록 한다.

2.5.3. 시험동물이 참기 힘들 정도로 고통스러워 할 경우 안락사 시키며 시험 중 사망한 동물로 처리한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

시험용량, 시험동물 수, 독성증상을 보이는 시험동물 수, 시험기간 중 치사동물 수, 독성발현 및 시간, 용량-독성반응 관계, 부검결과 등을 기록한다.

2. 시험결과의 보고

시험보고서는 다음의 항목을 포함한다.

2.1. 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2. 시험책임자 및 담당자 성명

2.3. 시험동물

종, 동물의 수, 연령, 공급원, 사육조건, 각 개체의 사육 조건

2.4. 시험물질

물질명과 CAS 번호, 물리적 특성 및 순도, 시험과 관련된 물리화학적 특성, 시험물질의 안정성

2.5. 시험용매명 및 선정사유

2.6. 시험조건

시험기간, 투여용량 수준 및 횟수, 먹이공급 시기

2.7. 시험결과

(1) 성별

(2) 용량별 독성반응 결과

(3) 사용동물 수, 체중변화, 사망 및 도살동물수, 독성증상을 보이는 동물 수, 피부 및 털, 눈 및 점막, 소화계, 호흡계, 순환계, 중추신경계, 행동유형, 독성증상 정도

(4) 용량별 독성반응 결과

사용 동물수, 체중변화, 사망 및 도살 동물수, 독성증상을 보이는 동물 수, 피부, 털, 눈, 점막, 소화계, 호흡계, 순환계, 중추신경계에 나타나는 독성증상(행동유형, 경련, 설사, 유연, 혼수상태 등)

(5) 독성증상을 보이는 시간 및 회복 시간

(6) 도살기준 및 근거

(7) 부검 결과

(8) 결과의 해석

그림 1. 예비시험 단계의 흐름도 (1)

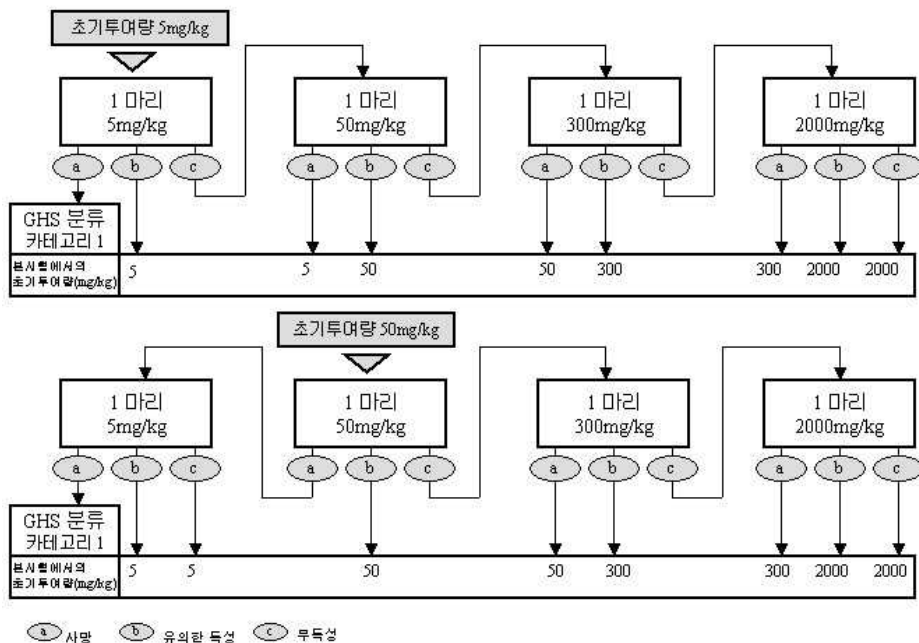


그림 1. 예비시험 단계의 흐름도 (2)

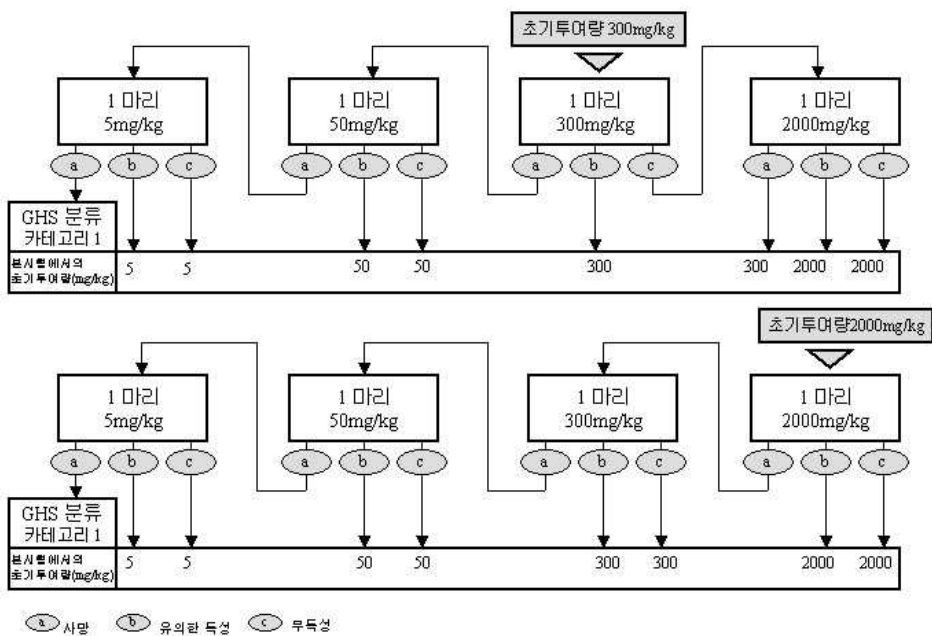


그림 2. 본시험 단계의 흐름도 (1)

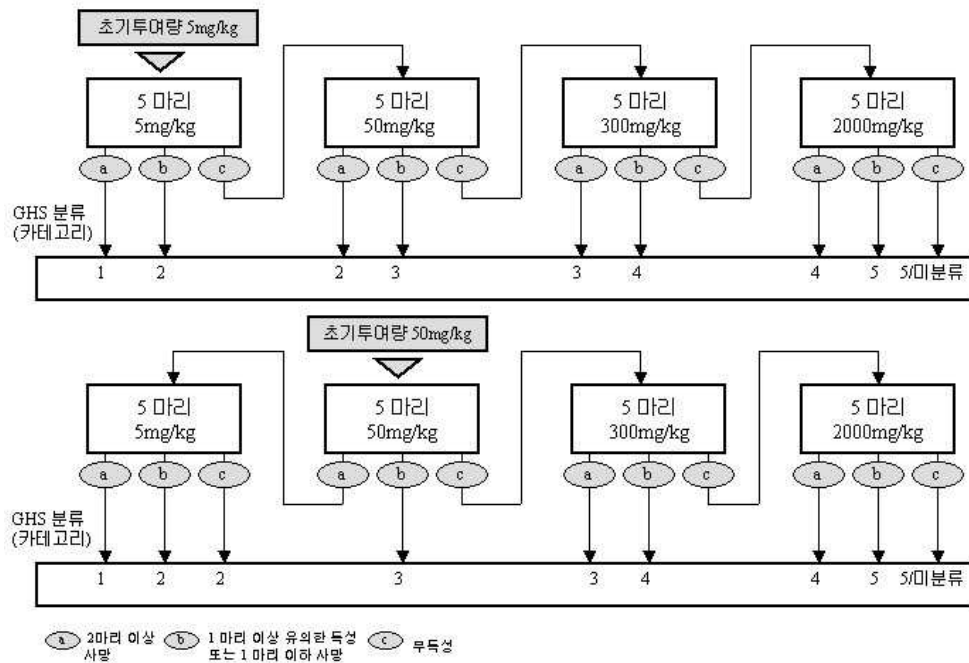
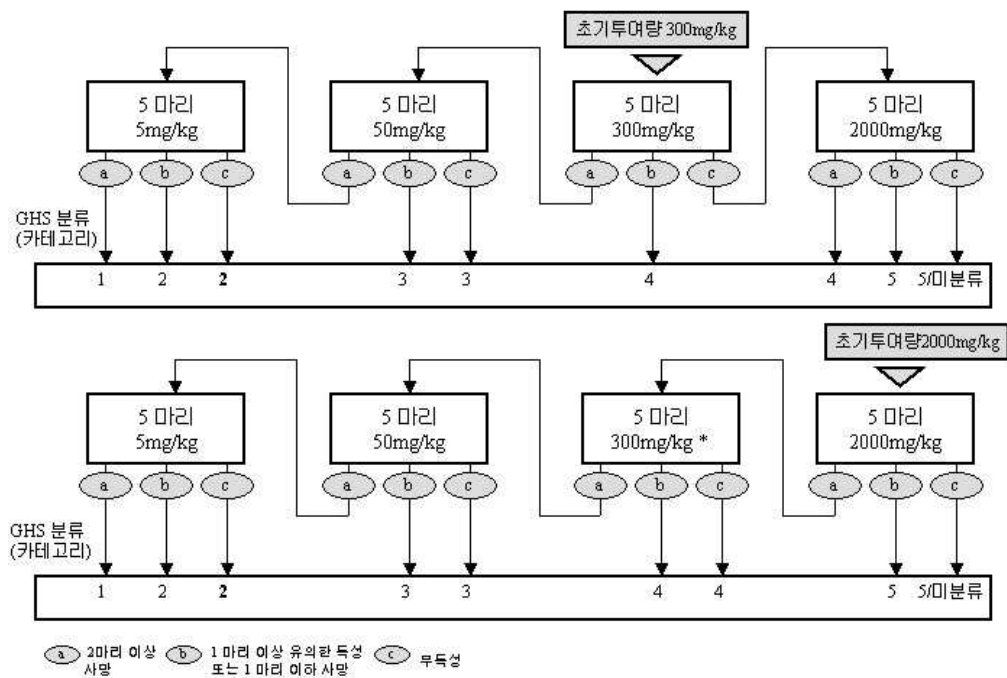


그림 2. 본시험 단계의 흐름도 (2)



제16항 생식 및 발달(발생)독성 스크리닝 시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 생식선기능(Gonadal function), 교미행동(Mating behavior), 수태(Conception), 태자의 발생, 분만과 같은 생식능에 대한 화학물질 및 혼합물의 영향과 관련 있는 정보를 얻는데 목적이 있다.

2. 정의

2.1 생식 독성(Reproduction toxicity)

차세대에 대한 유해한 영향 및(또는) 암수의 생식 기능 장애 혹은 능력 장애

2.2 모체 독성(Maternal toxicity)

직접 혹은 간접적으로 나타나는 수태한 암컷에 대한 부작용

2.3 번식능 장애(Impairment of fertility)

수컷 혹은 암컷의 생식 기능 혹은 능력 장애

2.4 발생 독성(Developmental toxicity)

차산자의 출생 전, 주산기 그리고 출생 후에 관찰되는 구조적 혹은 기능적 장애를 나타내는 생식 독성의 징후

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1 시험동물

시험에 사용되지 않은 건강하고 임신 경험이 없는 랫드를 사용한다. 시험에 사용되는 동물들의 무게 차는 최소로 하고, 동물 개체 무게와 각 성의 평균 무게와의

차는 $\pm 20\%$ 이하로 한다.

1.2 사육조건

사육실은 온도가 $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, 습도가 $30\% \sim 70\%$ 가 유지되도록 한다. 사육은 암·수를 구별하여 실시하며 각 개체의 상태 관찰이 용이하도록 밀도가 높지 않도록 한다. 조명은 명/암이 12 시간/12 시간이 되도록 조절하며, 사료와 물을 적절히 공급한다. 수태한 암컷은 한 마리씩 케이지에 두고, 깔집을 공급해야 한다. 그 밖의 동물실 환경조건은 일반적인 환경기준치에 따른다.

1.3 시험물질

시험 물질의 최대 1 회 경구 투여량은 수용액의 경우 $2\text{ mL}/100\text{ g}$ (체중), 비수용액의 경우 $1\text{ mL}/100\text{ g}$ (체중)을 초과하면 안 된다. 사료 혹은 음수를 통해 투여되는 경우 동물의 체중 당 일정한 투여량을 적용한다.

1.4 시험군의 구성 및 투여농도 설정

최소 3 개의 투여군과 1 개의 대조군으로 각 군당 암수 10 마리(수태한 암컷의 최소수는 8 마리)로 구성한다.

급성 독성 시험 혹은 반복 투여독성 시험 결과에 근거해, 투여농도를 결정한다. 시험 화합물 혹은 관련 있는 물질에 유용한 모든 독성 및 역학 데이터를 고려한 후 투여농도를 선택한다. 독성 영향은 유발하지만 죽거나 심한 고통은 주지 않도록 최대 투여농도를 선택해야 한다. 2 배 \sim 4 배의 공비를 두고, 투여농도를 줄이는 것이 이상적이다. 용량간격이 대단히 큰 경우(즉, 공비가 10 이상), 최저용량 시험군을 하나 더 둔다. 시험 물질을 투여할 때 용매를 사용하는 경우, 사용된 최대용량의 용매를 대조군에게 투여한다.

경구로 1 회 투여농도가 최소 $1,000\text{ mg/kg/day}$ 이거나 동일한 양의 시험물질을 사료 혹은 음수에 첨가·투여하여 어떠한 독성 영향도 발견할 수 없거나, 구조적으로 관련 있는 화합물에서 얻은 데이터를 근거해 독성이 발견되지 않는 경우에

는 한계시험을 진행할 수 있다.

2. 시험방법

2.1 원리

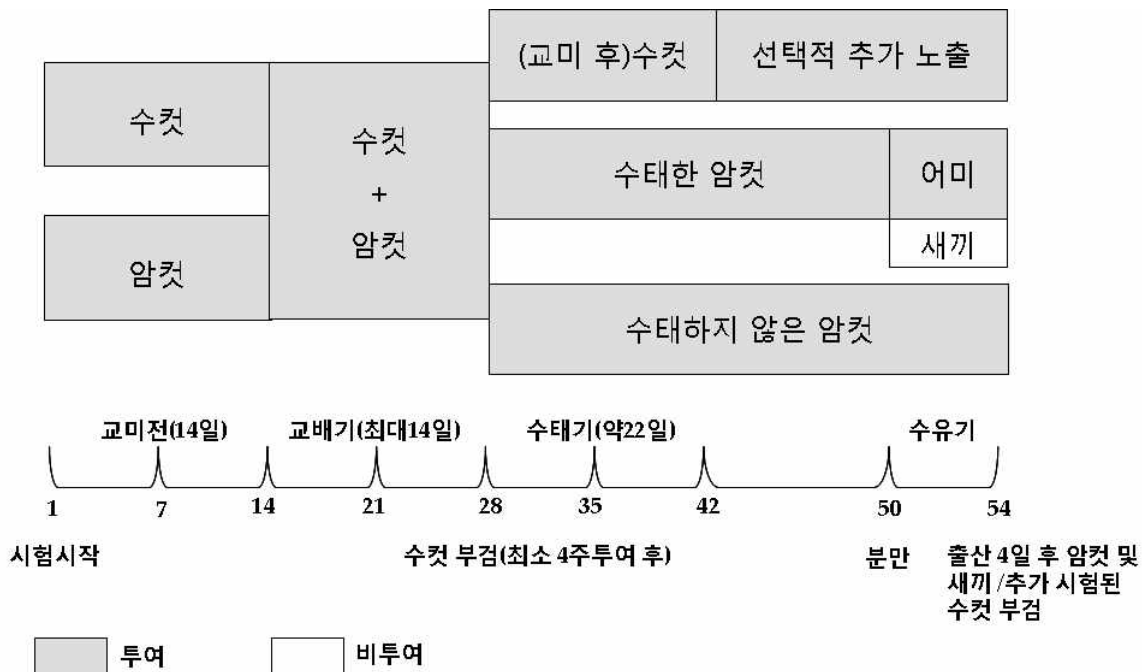
수컷은 교미 전 최소한 2 주, 교미 기간, 교미 후 약 2 주 동안 투여하고, 암컷은 교미 전 2 주, 수태 시기, 수태 기간, 분만 후 적어도 4 일 이상, 부검 전 날을 포함하여 전 시험기간 동안 단계적 용량의 시험물질을 각 군에 투여한다. 이 시험을 통해 수태부터 출산 후 4 일까지, 차산자의 성장 및 발생, 수태능, 번식능, 모체 및 수유 행동에 대해 예상되는 시험물질의 영향을 관찰한다.

2.2 교미 및 시험물질 투여

위관내주입법을 사용하여 경구 투여한다. 사료 혹은 음수를 통해 시험물질을 투여할 수도 있다. 위관내주입법으로 투여되는 물질은 매일 같은 시간에 투여해야 하고, 동물의 체중당 일정한 양으로 투여하기 위해 적어도 1 주일에 한 번은 각 시험동물의 체중을 측정하여야 한다.

최소 5 일 동안 순화 후, 교미 2 주 전부터 수컷과 암컷에게 시험 물질을 투여한다. 투여 시기는 시험동물이 성숙이 완료되는 시점으로 SD 랫드의 경우 10 주령, Wistar 랫드의 경우 12 주령이 적당하다.

교배기, 교미 후 28 일 동안 그리고 분만 후 수유기에도 투여를 계속한다. 교미는 일반적으로 암수 1 : 1로 진행하고 정자 혹은 질전(vaginal plug)이 관찰되면 수태 '0' 일로 정의한다. 출산일은 분만 후 0 일로 정의한다.



2.3 관찰사항

시험 기간 동안, 적어도 하루에 1 번 같은 시간에 임상증상을 관찰하고, 독성 징후가 관찰됐을 때는 더 자주 관찰해야 한다. 행동 변화, 분만이 어렵거나 지연되는 징후, 폐사를 포함한 모든 독성 징후를 시간 및 기간을 포함하여 기록한다.

임신 0 일부터 계산된 수태기간을 계산하고, 분만 후 24 시간(분만 후 0 일 혹은 1 일) 및 분만 4 일 후 생존한 차산자, 사망한 차산자, 작은 차산자 수 및 성별을 조사하고 체중 및 어미와 차산자 모두 이상행동을 기록한다.

2.3.1 체중 및 사료/음수 섭취량

투여 첫날, 수컷과 암컷의 체중을 측정한 후, 시험이 끝날 때까지, 적어도 1 주일에 1 번 체중을 측정한다. 수태 0 일, 7 일, 14 일, 20 일 후와, 분만 후 24 시간(분만 후 0 일 혹은 1 일) 내에 그리고 분만 후 4 일에 암컷의 체중을 측정한다. 사료 섭취량은 교미 후, 수태 기간, 수유 기간 동안 적어도 1 주일에 1 번 측정하고 시험물질이 음수를 통해 투여되는 경우 이 기간 동안 음수 섭취량도 측정해야 한다.

2.3.2 병리학적 관찰

시험동물 부검 시, 모든 이상 혹은 병리학적 변화 또는 생식 기관(착상수 및 황체수 등)을 조사해야 한다. 모든 동물 성체의 기관 고환 및 부고환 무게를 측정

하고, 특히 육안적 병변이 보이는 난소, 고환, 부고환, 보조 생식 기관 등은 고정·보관한다. 고환과 부고환의 고정은 Bouin 고정액을 사용한다. 고농도 시험군과 대조군 동물의 난소, 고환, 부고환에 대해 상세한 조직병리학검사를 실시하고 필요하면 다른 투여 시험군 또는 다른 장기도 조사한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

통계 분석을 사용하는 경우, 이 통계 분석은 조사된 변수 분포에 적합해야 하고, 시험을 시작하기 전에 선택해야 한다. 시험군의 크기가 작기 때문에, 시험을 이해하는데 도움을 받기 위해, 잘 알려진 대조군 데이터(즉, 한배 새끼 크기)를 사용하면 유용하다.

2. 결과의 평가

시험물질 투여군과 대조군과의 관계, 전체적 이상 영향, 확인된 표적기관, 불임, 임상적 이상, 생식 및 수태 능력, 체중 변화, 폐사 영향 등 기타 모든 독성 영향이 평가에 포함된다. 수컷에 대한 투여 기간이 짧기 때문에 수컷의 생식에 대한 영향을 평가하는 경우, 번식력 자료와 함께 고환과 부고환의 조직병리학적 결과를 반영한다.

3. 시험결과의 보고

시험보고는 다음의 항목을 포함한다.

3.1 시험기관의 명칭 및 소재지

3.2 시험책임자 및 담당자 성명

3.3 시험 및 대조 물질 정보

- IUPAC 또는 CAS 번호와 같은 화학물질명
- 시험물질의 순도 또는 실험용 혼합물(무게 %로 나타냄)의 배합, 물리적 특성 및 순도

- 시험의 수행과 관련된 시험물질의 물리적 상태(기체, 고체, 액체 등), pH, 안정성, 수용해도, 물리화학적 성상
- 물이 아닌 용매를 사용하였을 때, 선택 이유에 대한 적정성

3.4 시험 동물

- 동물의 종/계통
- 동물의 수, 주령, 성별
- 사육조건, 시험 시작 시, 각 동물의 체중

3.5 시험 조건

- 투여 용량 선정에 대한 이론적 근거
- 시험물질/제형 사료 준비내역, 달성된 농도, 안전성과 동질성 (균질성)
- 시험 물질 투여 내역에 대한 세부 사항
- 사료/음용수 시험 물질 농도(ppm)를 실제 투여량(mg/kg/day)으로 전환
- 사료 및 음용수 품질에 관한 사항

3.6 시험의 결과

- 체중, 사료 및 음용수 섭취량
- 번식력, 수태, 기타 모든 독성 징후를 포함한 성 및 투여별 독성 반응 데이터
- 수태 기간
- 생식, 차산자, 출생 후 성장 등에 대한 독성 혹은 다른 영향
- 임상 관찰의 특성, 심각성, 기간
- 생존한 차산자 및 착상 후 죽은 태자 수
- 전체적인 이상을 가진 차산자 수, 작은 차산자 수
- 시험 기간 동안 시험동물이 폐사한 시기 혹은 생존한 동물의 부검시기
- 착상한 태자 수, 황체의 수(권장사항), 한배 새끼 크기 및 체중
- 부검 동물의 체중 및 수태한 동물의 장기 무게
- 부검 결과
- 수컷 생식 기관 및 다른 조직에 대한 현미경 관찰 결과
- 결과에 대한 적절한 통계 방법

- <표>의 생식/발생독성 스크리닝 시험 요약보고서
- 무악영향관찰농도 (NOAEL)

3.7 결과의 고찰 및 결론

<표> 생식/발생독성 스크리닝 시험 요약보고서

관찰	값				
투여용량(단위)	0(대조군)
짜짓기 시작(N)					
교미 증거를 보여주는 암컷(N)					
수태에 성공한 암컷(N)					
수태 1~5 일(N)					
수태 6 일~ ⁽¹⁾ (N)					
수태 ≤ 21 일(N)					
수태 = 22 일(N)					
수태 ≥ 23 일(N)					
건강하게 출산한 어미(N)					
출산 후 4 일(pp)이 된 어미(N)					
황체/어미(평균)					
착상/어미(평균)					
생존한 차산자/출산한 어미(평균)					
생존한 차산자/출산 4 일 후 어미(평균)					
출생한 차산자의 성 비율(수컷/암컷)(평균)					
출생 4 일 후 차산자의 성 비율(수컷/암컷)(평균)					
출생한 한배 새끼의 평균체중					
출생 4 일 후 한배 새끼의 평균체중					
출생한 차산자의 4 일 후 평균체중					
출생한 차산자의 평균체중					
비정상적인 차산자					
‘0’ 인 어미					
‘1’ 인 어미					
‘ ≥ 2’ 인 어미					
죽은 차산자					
착상 전(황체 - 착상)					
‘0’ 인 암컷					
‘1’ 인 암컷					
‘2’ 인 암컷					
‘ ≥ 3’ 인 암컷					
출생 전/착상 후(착상 - 생존한 차산자)					
‘0’ 인 암컷					
‘1’ 인 암컷					
‘2’ 인 암컷					
‘ ≥ 3’ 인 암컷					
출생 후(생존한 차산자 - 출생 4일 후 생존한 차산자)					
‘0’ 인 암컷					
‘1’ 인 암컷					
‘2’ 인 암컷					
‘ ≥ 3’ 인 암컷					

⁽¹⁾ 교미 기간 마지막 날

제17항 생식능 및 차세대 영향시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 고환기능, 난소주기, 교배능력, 수태능 등의 생식능 및 태자의 발 병 율, 사망률, 최기형성과 같은 발생독성에 관한 일차적 정보를 얻는데 그 목적이 있다.

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1 시험동물

1.1.1 동물종

랫드나 마우스 등 1 종 이상의 동물을 사용하는데, 최기형성시험에 사용되는 동물종과 동일한 동물을 선택한다. 동물종, 계통 또는 품종을 선택하는데 있어서는 수태능력, 자연발생기형의 발생빈도, 기타 생식독성물질에 대한 감수성 등을 고려한다. 만성독성시험과 같은 동물종을 사용할 때는 계통까지도 같은 것으로 한다.

1.1.2 동물수

랫드나 마우스 사용시 처치군과 대조군에서 각각 20 마리 정도의 임신동물이 얻어질 수 있도록 암수를 준비한다.

2. 시험방법

2.1 원리

동물의 암수에 시험물질을 수컷에게는 적어도 1 회의 정자형성기간 동안 암컷에게는 2 회 이상의 발정주기 동안 투여하고 암수를 교미시켜 임신기간 및 수유기 동안 계속 시험물질을 투여하여 시험물질의 생식능 및 후세대에 발생에 미치는 영향을 조사한다.

2.2 시험물질

2.2.1 투여방법

원칙적으로 경구투여를 한다. 시험물질은 사료나 음료수에 첨가하여 투여하도록 한다. 사료에 첨가하는 시험물질의 농도는 5 %(w/w) 이하로 한다. 시험물질의 성상이 경구투여 할 수 없는 경우는 비경구투여로 한다.

2.2.2 용량

최대 무작용량을 알기 위하여 적어도 3 단계 용량의 시험군을 설정한다. 최고용량은 양친동물(P)에 섭이량의 저하나 체중증가 억제 등 약간의 독성징후를 나타내지만, 10 % 이상의 사망율은 나타나지 않는 양으로 한다. 최저용량은 생식능 및 후세대의 발생에 독성영향을 나타내지 않는 양으로 한다. 대조군은 별도로 둔다.

2.3 교배와 시험물질의 투여

(1) 부친동물에는 5 주령 ~ 8 주령 일때부터 시험물질을 투여하는 데 교미 전 10 주간(마우스는 8 주간)이상 시험물질을 매일 투여한 후 교배에 임한다. 모친동물에는 적어도 교배 전까지 2 주간 계속 투여하고 다시 3 주간의 교배 및 임신기간, 그리고 F1의 이유시까지 매일 투여한다. 암수의 동거기간은 2 주 ~ 3 주간 정도로 하는데 그동안 매일 교미의 유무를 확인한다.

(2) 교미가 확인된 암컷은 분리사육하고 자연분만시켜 제 1 세대(F1)를 얻는다. 한 어미에서 태어난 새끼들의 수를 조정할 때에는, 출생 후 비교적 빠른 시기에 새끼들의 암수 숫자를 동일하게 일정한 마리수를 무작위로 남긴다.

(3) F1을 이유시키는 단계에서 차세대를 얻기 위한 동물을 무작위로 선택하고 나머지는 부검한다. 차세대를 얻기 위한 동물에는, 이유 후 부친동물에서와 마찬가지로 시험물질을 10 주간(마우스에서는 8 주간) 이상 투여한 후, 원칙적으로는 각각 다른 어미에서 태어난 암수끼리 20 쌍 이상을 만들어 양친동물과 마찬가지로 교배시켜 제 2 세대(F2)를 얻는다. F2는 원칙적으로 이유 후 성 성숙기에 이르기까지 시험물질을 투여하고 사육한다.

2.4 관찰사항

2.4.1 P

일반상태 및 사망의 유무를 관찰하고, 체중 및 섭이량(필요에 따라 섭취량)을 측정하고, 시험물질 섭취량을 산출한다.

P의 수컷에 대해서는 교미율 및 수태율을 산출한다. 또 P의 암컷에 대해서는 분만의 이상유무를 검색하고 출산율을 산출한다(주 1).

F1 이유시에 어미는 부검하고, 내부기관을 관찰한다.

F의 수컷, 그리고 교미, 임신, 출산을 하지 않은 암컷은 적절한 시기에 도살하여 내부기관을 관찰한다(주 2).

2.4.2 F1

갓 태어난 F1에 대해서는 출생 새끼수, 생사확인, 성별, 체중 및 외관의 변화 등을 조사한다.

출생 후는 일반상태, 사망의 유무, 성장 및 형태와 기능의 발달을 관찰 한다. 적어도 주 1 회 체중을 측정한다. 적당한 시기마다 생존율을 산출하고 이유시에 이유율을 산출한다(주 3).

F2를 얻기 위한 교배용의 F1에 대해서는 P와 마찬가지로의 검색을 하며, 나머지 F1은 이유시에 부검한다.

2.4.3 F2

F1과 동일한 방법으로 관찰을 하며, 원칙적으로 성 성숙기에 부검한다. 필요에 따라 조직학적 검사 또는 혈청 생화학적 검사를 한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

관찰된 이상상태나 독성증상과 시험물질의 투여량과의 관계에 대해서는 적절한 통계학적 수법을 이용하여 고찰하고, 무악영향관찰량에 대해서 견해를 밝힌다. 이때 이유까지는 한배의 새끼들을 표본단위로 한다.

2. 시험결과의 보고

시험보고서는 다음의 항목을 포함한다.

- 2.1 시험기관의 명칭 및 소재지
- 2.2 시험책임자 및 담당자 성명
- 2.3 시험동물: 종, 계통, 체중, 주령, 성 및 사용수
- 2.4 시험물질투여 등에 의한 독성반응자료
- 2.5 시험기간 중 사망시간, 또는 시험 종료 후 생존 동물수
- 2.6 각 동복 태아의 체중, 신생자의 평균체중 및 종료시 신생자 개별 체중표
- 2.7 각 종의 이상 징후의 관찰시기 및 그 후의 경과
- 2.8 P 동물 체중의 성적
- 2.9 부검소견
- 2.10 현미경을 통한 검사소견
- 2.11 통계적처리

주 1) 다음의 계산법에 의한다.

$$\text{교미율} = (\text{교미동물수} / \text{동거동물수}) \times 100$$

$$\text{수태율} = (\text{임신동물수} / \text{교미동물수}) \times 100$$

$$\text{출산율} = (\text{출산어미수} / \text{임신어미수}) \times 100$$

주 2) 수컷은 보통 교배기간이 끝났을때 도살한다. 암컷에 대해서는 교미가 되지 않은 것은 교배기간이 끝났을때, 또 임신이나 출산이 안된 것은 교미일부터 계산해서 출산예정일을 2 일 ~ 3 일 경과한 때에 도살한다.

주 3) 보통, 다음의 계산법에 의한다.

$$\text{생존율} = (\text{검사시의 생존새끼수} / \text{출산시의 새끼수, 생후 4 일 또는 도태직후의 생존 새끼수 또는 이유시의 생존새끼수}) \times 100. \text{ 검색의 시기에 따라 분모가 다르다.}$$

$$\text{이유율} = (\text{이유시 생존새끼수} / \text{생후 4 일 또는 도태 직후의 생존새끼수}) \times 100$$

제18항 급성 경구독성시험(독성등급법)

I. 개요

1. 목적

이 시험은 시험동물의 보호를 위해 시험물질에 의한 사망 또는 고통을 가급적 줄이고자 최소한의 동물에 시험물질을 경구 투여하여 급성독성 증상을 관찰하는데 목적을 둔다.

2. 정의

2.1. 급성경구독성

시험물질을 (24 시간 이내에) 1 회 또는 수회 경구투여한 후 단시간 내에 나타나는 악영향(Adverse effects)

2.2. 투여량(Dose)

투여하는 시험물질의 양. 일반적으로 단위는 시험동물의 단위무게(체중) 당 시험물질의 무게(예, mg/kg)로 표시

2.3. 빈사 상태(Moribund state)

시험물질의 독성에 의하여 시험동물이 죽어가는 상태 또는 생존할 가망이 없는 상태

2.4. 지연 사망(Delayed death)

시험물질 투여 후 48 시간 이내에 사망 또는 빈사상태에 도달하지는 않으나 투여 후 14 일간의 관찰기간 동안 사망하는 경우

2.5. GHS (Globally harmonized classification system for chemical substances and mixtures)

국제적으로 공인되고 조화된 화학물질 및 혼합물의 분류 시스템

2.6. 사망 임박(Impending death)

다음 관찰 시기 전 사망 또는 빈사상태가 예견되는 상태로서 경련을 일으키거나 옆으로 누워있는 상태가 관찰되는 상황

2.7. 예측 사망(Predictable death)

시험이 종료되기 전 사망을 예측 가능하도록 임상학적인 징후를 보이는 상태(예, 물이나 먹이에 접근하지 못하거나, 물이나 먹이를 먹지 못하는 상태)

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1. 시험동물

시험이 시작되는 시점에 연령이 8 주령 ~ 12 주령 된 시험용 랫드(다른 설치류도 가능)를 사용하며 개체 간 체중 차이는 평균 체중의 $\pm 20\%$ 를 넘지 않도록 한다. 시험은 한쪽 성을 사용하는데 암컷을 사용하는 것을 원칙으로 하며, 수컷을 사용할 경우 타당한 사유를 제시한다. 암컷은 과거에 새끼를 낳은 적이 없고 현재 임신 중이지 않는 개체를 사용한다. 시험에 사용할 개체는 시험 시작 전 최소 5 일 이상 실험실에서 순화시킨 건강한 동물 중에서 무작위로 선정한다. 각 동물의 식별을 용이하게 하기 위해 개개의 동물에 표시를 한다.

1.2. 사육조건

사육실은 온도가 $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, 습도가 $30\% \sim 70\%$ 가 유지되도록 한다. 사육은 암·수를 구별하여 실시하며 각 개체의 상태 관찰이 용이하도록 밀도가 높지 않도록 한다. 조명은 명/암이 12 시간/12 시간이 되도록 조절하며, 먹이와 물을 적절히 공급한다.

1.3. 시험물질

시험물질은 적당한 용매에 용해 또는 현탁시킨다. 시험물질은 수용성 액이 우선

적으로 권장되나, 비수용성인 물질의 경우 오일(예, 옥수수기름) 또는 기타 다른 용매를 사용한다. 이때 사용하는 용매는 사전에 독성 여부와 특성이 잘 알려진 것을 사용한다.

2. 시험방법

2.1. 원리

한계시험 또는 분시험에서는 단일 성(가능한 압축을 우선으로 함)의 동물을 사용하여 제시된 용량에 대해 단계적으로 시험한다. 시작 용량은 기존의 독성자료에 근거하여 선정하는데 사망동물이 관찰될 수 있을 것으로 예측되는 용량으로 한다. 시작 용량의 경과에 따라 다음 용량을 결정한 후 단계적으로 투여한다.

2.2. 시험물질의 투여

2.2.1. 경구 투여하는 시험물질의 양은 시험동물의 크기에 따라 다르나, 일반적으로 최대 1 mL/100 g(체중)을 넘지 않도록 한다. 다만 수용액의 경우는 2 mL/100 g까지 허용한다.

2.2.2. 투여는 1 회 투여를 원칙으로 하되 불가능할 경우 소량씩 나누어 실시한다. 이때 투여 간격은 24 시간이 넘지 않도록 한다.

2.2.3. 시험물질을 투여하기 전날 저녁부터 물을 제외한 먹이 공급을 중단하고 체중을 측정한다(마우스의 경우는 투여 전 3 시간 ~ 4 시간 전부터 먹이 공급을 중단한다). 절식후의 체중을 기준으로 시험물질을 경구투여한다. 시험물질의 경구투여 후 3 시간 ~ 4 시간 후(마우스의 경우는 1 시간 ~ 2 시간 후)부터 먹이를 공급한다. 시험물질을 소량씩 나누어 투여할 경우, 투여 간격을 고려하여 소량씩 여러 번 물과 먹이를 적절히 제공한다.

2.3. 한계시험(limit test)

2.3.1. 한계시험은 해당 시험물질 또는 시험물질과 유사한 특성을 지닌 물질의 독성이 비교적 낮거나 무독성으로 예상되는 경우에만 수행한다.

2.3.2. 한계시험은 한 가지 농도인 2,000 mg/kg(체중)을 투여한다. 시험물질의 투여는 6 마리를 대상으로 하는데 3 마리씩 2 단계로 수행한다. 1 단계에서 투여한 3 마리에서 관찰되는 사망(또는 빈사상태) 정도에 따라 다음 단계로 넘어간다. 사망(또는 빈사상태) 개체수가 0 마리 ~ 1 마리의 경우는 2 단계에서 3 마리에 대해 동일농도(2,000 mg/kg)를 재차 투여하며, 이때 0 마리 ~ 1 마리가 사망(또는 빈사상태)하는 경우, 시험물질을 GHS 카테고리(Category) 5로 등급을 분류한다. 한편 1 단계 또는 2 단계에서 사망(또는 빈사상태) 개체수가 2 마리 ~ 3 마리로 발생하는 경우, 이보다 저농도(300 mg/kg)에서 시험을 수행한다(그림 1 참조).

2.3.3. 시험물질의 독성이 없다고 예상되거나 관련 정보 및 걱정 사유가 있는 경우, 한계시험을 5,000 mg/kg에서 수행할 수도 있다. 이때 1 마리에 먼저 투여했을 때 바로 사망하면 2,000 mg/kg부터 다시 시험을 수행한다. 반면, 사망하지 않는 경우 순차적으로 2 마리에 계속 투여했을 때 모두 사망하지 않는 경우(3 마리 모두 사망하지 않는 경우)는 미분류(unclassified) 등급으로 구분하며, 1 마리가 사망하는 경우 LD₅₀이 5,000 mg/kg을 상회하는 것으로 판단하고, 2 마리 모두 사망할 경우 2,000 mg/kg 농도에서 시험을 수행한다(그림 1 참조).

2.3.4. 한계시험의 관찰기간 및 방법은 본 시험에서와 동일하게 한다.

2.4. 본시험

2.4.1. 각 시험용량에 대해 단일 성(암컷을 우선으로 함)인 3 마리를 시험동물로 사용한다.

2.4.2. 시험 시작은 제시된 용량(5 mg/kg, 50 mg/kg, 300 mg/kg, 2,000 mg/kg) 가운데서 독성 증상(사망 또는 빈사상태)이 나타날 것으로 예측되는 용량 하나를 선택하여 3 마리씩 투여하고, 이때 나타난 결과를 통해 다른 농도에서 시험을 계속 진행한다(그림 1 ~ 4 참조). 상기 4 가지 고정된 용량 가운데 2,000 mg/kg에서 시험을 시작하는 경우는 이를 한계시험이라 할 수 있다.

2.4.3. 시험물질 또는 이와 유사한 물질의 독성정보가 없는 경우, 300 mg/kg 용량으

로 시험을 시작한다.

2.4.4. 관찰기간은 일반적으로 14 일 실시하는데 관찰기간은 고정적이지는 않으며 독성반응, 속도, 회복기간 등에 따라 변경될 수 있다.

2.4.5. 관찰은 투여 후 30 분 이내에 적어도 한번 관찰하고, 특히 투여 후 처음 4 시간은 특별한 주의를 기울여 관찰하도록 한다. 이후 14 일까지 적어도 매일 1 회 이상 관찰한다.

2.4.6. 시험물질의 투여 후 시험동물의 증상(사망 또는 빈사상태)이 명확히 관찰된 경우, 다음 시험단계로 진행한다. 빈사 상태의 동물은 안락사 시킨다.

2.4.7. 독성 증상이 나타나기 시작한 시간과 소멸되기 시작한 시간은 매우 중요하므로 모든 관찰은 체계적으로 기록되어야 하며, 개체별로 기록하여야 한다.

2.4.8. 관찰은 피부 및 털, 눈 및 점막, 호흡계, 순환계, 자율 및 중추신경계, 행동 유형을 포함한다. 특히 경련, 설사, 유연, 혼수상태 등의 증상은 유의하여 관찰한다.

2.4.9. 체중은 시험물질 투여 직전과 종료 후 부검 직전 측정하며, 시험기간 중에는 주 1 회 측정을 원칙으로 하는데 이때 체중 변화를 계산하여 반드시 기록하도록 한다. 시험 중 사망 및 빈사동물을 포함하여 모든 시험동물은 부검 후 소견을 기록한다. 필요시 부검 후 조직병리학적 관찰을 통한 소견을 기록한다.

2.5. 시험상의 유의사항

2.5.1. 부식성이나 자극성이 큰 물질의 경우 시험동물에 고통을 주므로 되도록 시험을 피하도록 한다.

2.5.2. 시작농도 선택에 신중을 기함으로써 시험동물의 수를 가능한 최소화 하여야 한다.

2.5.3. 시험동물이 참기 힘들 정도로 고통스러워할 경우 안락사 시키며 시험 중 사망한 동물로 처리한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

시험용량, 시험동물 수, 독성증상을 보이는 시험동물 수, 시험기간 중 치사동물 수, 독성발현 및 시간, 용량-독성반응 관계, 부검결과 등을 기록한다.

2. 시험결과의 보고

시험보고서는 다음의 항목을 포함한다.

2.1. 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2. 시험책임자 및 담당자 성명

2.3. 시험동물

종, 시험동물의 수, 성별, 연령, 공급원, 먹이 종류, 각 개체의 사육 조건

2.4. 시험물질

물질명과 CAS 번호, 물리적 특성 및 순도, 시험과 관련된 물리화학적 특성, 시험물질의 안정성, 기타 정보

2.5. 시험용매명 및 선정사유

2.6. 시험조건

시험기간, 투여용량 수준 및 횟수, 먹이공급 시기

2.7. 시험결과

(1) 성별

(2) 용량별 독성반응 결과

(3) 사용동물 수, 체중변화, 사망 및 빈사 동물수, 독성증상을 보이는 동물 수, 피부 및 털, 눈 및 점막, 소화계, 호흡계, 순환계, 중추신경계, 행동유형, 독성증상 정도

(4) 용량별 독성반응 결과

사용 동물수, 체중변화, 사망 및 도살 동물수, 독성증상을 보이는 동물 수, 피부, 털, 눈, 점막, 소화계, 호흡계, 순환계, 중추신경계에 나타나는 독성증상(행동유형, 경련, 설사, 유연, 혼수상태 등)

(5) 독성증상을 보이는 시간 및 회복 시간

- (6) 빈사판정 기준 및 근거
- (7) 부검 결과(조직 관찰시 조직병리학적 소견)
- (8) 결과의 해석

2000mg/kg 농도로 시험을 시작하는 경우

시작
▽
시험동물의 특성이 없다고 예상되며, 관련 정보 및 격정사유가 있는 경우
시작
▽

1단계

5mg/kg 3 마리
2-3 0-1

50mg/kg 3 마리
2-3 0-1

300mg/kg 3 마리
2-3 0-1

2000mg/kg 3 마리
2-3 0-1

2단계

5mg/kg 3 마리
2-3 0-1

50mg/kg 3 마리
2-3 0-1

300mg/kg 3 마리
2-3 0-1

2000mg/kg 3 마리
2-3 0-1

5000mg/kg 3 마리
1-3 0

GHS

카테고리 1 > 0 - 5

카테고리 2 > 5 - 50

카테고리 3 > 50 - 300

카테고리 4 > 300 - 2000

카테고리 5 > 2000 - 5000

미분류 ∞

LD50 cut-off (mg/kg)

5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2000 이상 5000 이상

- 단계 당 3마리의 시험동물을 사용 (한쪽 성, 암컷을 원칙) - ①, ②, ③ 각 단계에서 사망 (또는 빈사상태) 개체 수

- GHS : Globally Harmonized Classification System (mg/kg b.w.) - ∞ : 미분류 (undassified)

300mg/kg 농도로 시험을 시작하는 경우

시작

1단계

5mg/kg 3 마리

50mg/kg 3 마리

300mg/kg 3 마리

2000mg/kg 3 마리

2단계

5mg/kg 3 마리

50mg/kg 3 마리

300mg/kg 3 마리

2000mg/kg 3 마리

GHS

카테고리 1 > 0 - 5

카테고리 2 > 5 - 50

카테고리 3 > 50 - 300

카테고리 4 > 300 - 2000

카테고리 5 > 2000 - 5000

LD50 Cut-off (mg/kg)

5

25

30

50

200

300

500

1000

2000

2000 이상

1단계 50mg/kg 에서 3마리 사망 그외

1단계 300mg/kg 에서 3마리 사망 그외

3

2

- 단계 당 3마리의 시험동물 사용 (한쪽 성, 암컷을 원칙)

- GHS : Globally Harmonized Classification System (mg/kg b.w)

- 0, 1, 2, 3 각 단계에서 사망 (또는 빈사상태) 개체 수

그림 3. 본시험 단계의 흐름도

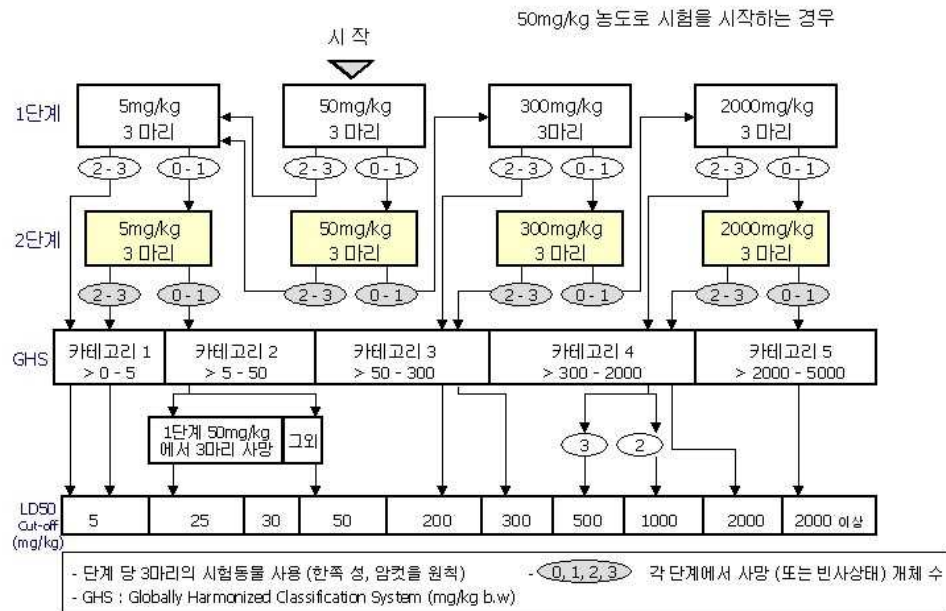
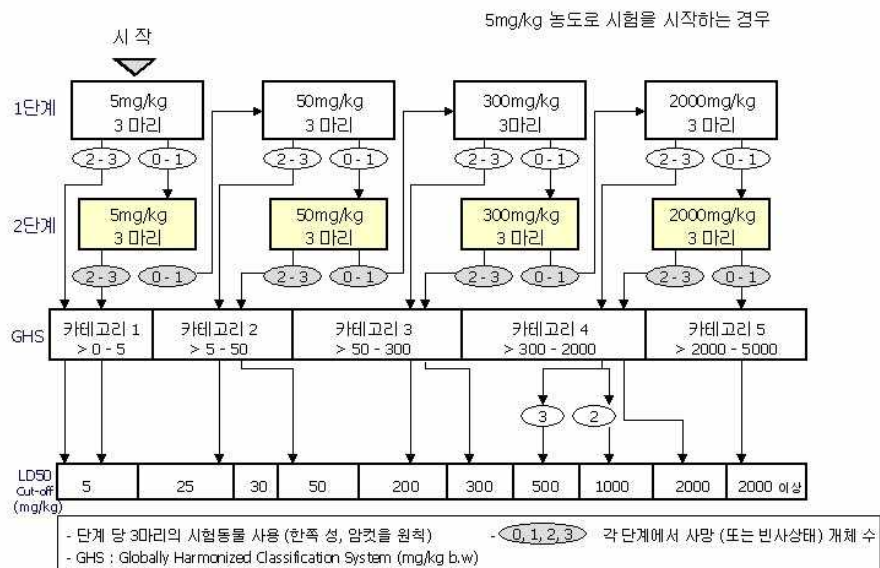


그림 4. 본시험 단계의 흐름도



제19항 신경독성시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 유기인계 물질에 노출되었을 때 지속적 또는 지발성 운동실조의 신경독성작용이 나타나는지 관찰하는 것을 목적으로 한다.

2. 정의

2.1 급성지발성 신경독성

시험물질을 1 회 투여하였을 때 나타나는 지속적이고 지발적으로 나타나는 보행성 운동 실조 등의 신경독성

2.2 아급성지발성 신경독성

시험물질을 수일동안 반복투여하였을 때 나타나는 지속적이고 지발적인 운동으로 나타나는 보행성 운동 실조 등의 신경독성

가. 급성 지발성 신경독성시험

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1 시험동물

1.1.1 동물종 및 성

산란용으로 키우는 성숙한 암탉으로 표준크기의 일반적인 계통 및 품종을 사용하고 질병 및 약물투여한 적이 없으며 시험시작 5 일전에 실험실 조건에 순응시켜야 한다.

1.1.2 연령

8 개월 ~ 14 개월이 적당하다.

1.1.3 동물수

시험기간중 적어도 6 마리가 생존할 수 있도록 충분한 닭을 준비한다.

1.1.4 대조군

시험에는 적절한 대조군을 두어야하는데, 적어도 2 마리 이상의 이미 알려져 있는 지발성 신경독 (TOCP, Tri-orthocresyl phosphate)을 처치한 양성 대조군과 2 마리 이상의 무처리 대조군을 둔다.

1.1.5 사육 및 급이조건

시험우리는 시험동물이 운동하기에 충분한 공간을 유지해야 하며 보행관찰이 용이해야 한다. 조명은 인공조명으로 하며 12 시간 광주기 상태로 유지한다.

2. 시험방법

2.1 원리

시험물질을 암탉에 1 회 경구로 투여하고 21 일 동안 행동이상, 운동신경마비 등 지발성 신경독성을 관찰한다.

2.2 시험물질

2.2.1 투여방법

시험물질의 투여는 보통 경구투여기, 젤라틴 캡슐 또는 그에 준하는 방법을 사용하여 경구적으로 투여한다.

2.2.2 용량

시험물질의 투여량은 보호제를 투여하지 않을 경우에 LD₅₀ 이하로 내려가지 않는 양으로 한다. 시험물질에 의한 급성 콜린(Choline) 작용성 신경작용에 의한 사망을 막기 위하여 아트로핀이나 시험을 방해하지 않는 다른 보호제를 사용해도 좋다. 시험물질의 용량이 5,000 mg/kg 이상을 넘어가는 경우는 실시하지 않아도 된다.

2.2.3 투여기간

1 회 투여하고 21 일간 매일 관찰하는데, 신경독성증상이 나타나지 않거나 불명확할 경우에는 동일용량을 재투여하여 다시 21 일간 관찰한다.

2.3 관찰 및 측정사항

시험물질과 대조물질을 투여한 닭은 적어도 주 2 회 사육 케이지에서 밖으로 꺼내 강제운동을 시켜보아야 하며, 이때 닭들의 행동이상, 운동실조, 마비 등의 항목에 대해 관찰하여, 그러한 독성의 징후와 그 발현시간, 정도 및 지속시간을 기록한다. 시험 종료 후 모든 동물은 부검하여 육안 및 조직병리학적 검사를 실시한다. 체중은 주 1 회 측정한다.

2.4 병리검사

시험에 사용된 닭의 장기는 모두 관류 고정하며 검사 장기에는 연수, 척수 및 말초 신경이 포함되어야 한다. 척수는 상경부, 흉부 중앙 및 요선부의 조직, 그리고 경골 신경의 근위부 및 분지부의 조직도 검사해야 한다. 염색은 myelin 및 축삭 특수 염색법을 기본적으로 실시한다.

III. 시험결과의 보고

1. 결과의 처리

시험군당 사용동물수, 반응형태, 반응을 보인 동물의 비율등을 대조군과 비교하여 신경독성 정도를 테이블 형태로 종합한다.

2. 시험결과의 보고

시험보고는 다음의 항목을 포함해야 한다.

2.1 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명

2.3 각 군에 대하여 신경계 장애의 임상적 증상을 기재한 독성반응의 성적

2.4 각종 동물에 대한 시험기간 중의 사망시기 혹은 실험 종료시의 생존의 유무

2.5 이상소견이 나타난 시기 및 그 경과

2.6 체중변화

2.7 시험종료시의 각 동물의 부검소견

2.8 병리조직학적 소견

2.9 시험결과와 통계학적 처리

나. 아급성 지발성 신경독성시험(90 일 시험)

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1. 시험동물

1.1.1 동물종 및 성

산란용으로 키우는 성숙한 암탉으로 표준적인 계통 및 품종을 사용하고 질병 및 약물투여한 적이 없으며 시험시작 5 일전 실험실 조건에 순응시켜야 한다.

1.1.2 연령

8 개월 ~ 14 개월이 적당하다.

1.2.3 동물수

처리군과 대조군에 각각 10 마리를 준비한다.

1.2.4 대조군 : 급성지발성 신경독성시험과 동일

1.2.5 시험환경 : 급성지발성 신경독성시험과 동일

III. 시험방법

2.1 원리

몇 가지 용량의 시험물질을 암탉에 90 일 동안 경구로 투여한 후 행동 이상, 운동신경 마비 등 지발성 신경독성을 관찰한다. 시험기간이 완료되면 특정 부위의 신경조직의 병리검사를 실시한다.

2.2 시험물질

2.2.1 투여방법

적어도 1 주에 5 일간은 계속 경구투여하도록 하는데, 강제투여나 젤라틴 캡슐에

의하여 투여한다.

2.2.2 용량

대조군이외에 적어도 3 단계의 용량군을 두도록 한다. 최고용량은 독성효과를 나타내지 않은 양으로 사망을 일으키지 않는 지발성 신경독성을 나타내는 양이 제일 좋다. 최저용량은 어떠한 독성증상도 나타내지 않은 양으로 한다.

2.2.3 투여기간

투여기간은 90 일이다.

2.3 관찰 및 측정사항

시험물질과 대조물질을 투여한 닭에 대해 행동이상, 운동실조, 마비 등의 항목에 대해 관찰하는데 그 외의 미세한 반응의 관찰을 보강하기 위하여 적어도 주 1 회 정도 닭을 케이지 밖으로 꺼내어 강제운동을 시켜 보아야 하며, 이때에 나타나는 독성징후와 그 발현시간, 정도 및 지속시간을 기록한다. 시험종료후 모든 동물은 부검하여 육안 검사와 병리조직학적 검사를 실시한다. 체중은 주 1 회 측정한다.

2.4 병리검사

시험에 사용된 닭의 장기는 모두 관류 고정하며 검사장기에는 연수, 척수 및 말초 신경이 포함되어야 한다. 척수 상경부, 흉부 중상 및 요선부의 조직, 근위부의 경골 신경과 그 분지부 및 좌골 신경도를 검사한다. 염색은 적절한 Myelin 염색이나 축삭 특수염색을 실시한다. 고용량 투여군에서 시험물질의 영향에 의한 병변이 발견되었을 때에는 저용량군 및 중간 용량군의 관찰 장기에 대해서도 현미경 검사를 해야 한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

시험군 당 사용동물수, 반응형태, 반응을 보인 동물의 비율 등을 대조군과 비교

하여 신경독성 정도를 테이블 형태로 종합한다. 관찰된 모든 결과를 시험계획 당시에 선정된 통계기법으로 대조군과 비교한다.

2. 시험결과의 보고

시험보고는 다음의 항목을 포함해야 한다.

2.1 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명 - 투여량(mg/kg)

2.3 각 군마다의 신경계장해에 관한 임상적 징후를 기재한 독성반응의 성적

2.4 시험기간 중의 사망시기 및 시험종료시의 생존의 유무

2.5 각종의 이상증상이 나타난 시기와 그 후의 경과

2.6 체중변화

2.7 시험 동물의 부검 및 조직병리학적 소견

2.8 시험결과의 통계학적 처리

제20항 생체외 피부 부식성시험(피부 전기저항성 시험)

I. 개요

1. 목적

이 시험은 살아있는 동물이 아닌 생체외(*In vitro*)에서 피부 부식성 및 피부 자극에 대한 시험을 통해 부식성 있는 화학물질 또는 혼합물의 특성을 평가하는데 그 목적이 있다.

2. 정의

2.1. 생체내(*In vivo*) 피부 부식성

피부에서의 회복 불가능한 손상 유발. 부식성 반응은 표피에서 진피까지 육안으로 관찰 가능한 조직 괴사가 일어나는 경우로서, 시험물질을 4 시간까지 처리했을 때는 궤양, 출혈, 혈액딱지가 형성되며 14 일 이후에는 피부 표백, 탈모 및 상흔이 유발 되는 것. 단, 확실하지 않은 손상에 대해서는 조직병리학적 검사 필요

2.2. 경피성 전기 저항(Transcutaneous electrical resistance: TER)

피부에서의 전기적 저항 수치. 단위는 $k\Omega$ 으로 나타내며, 전기저항 측정(Wheatstone bridge) 장비를 이용하여 피부의 이온 투과성을 기록함으로써 피부의 장벽 기능을 평가하는 방법

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1. 시험동물

1.1.1. 동물종의 선택

화학물질의 부식성에 대해 적절한 감도를 가진 랫드를 사용한다. 시험동물은 성체 모근에서 털이 자라나기 시작하기 전, 모낭이 활성화되기 이전의 연령 및 종을 사용한다.

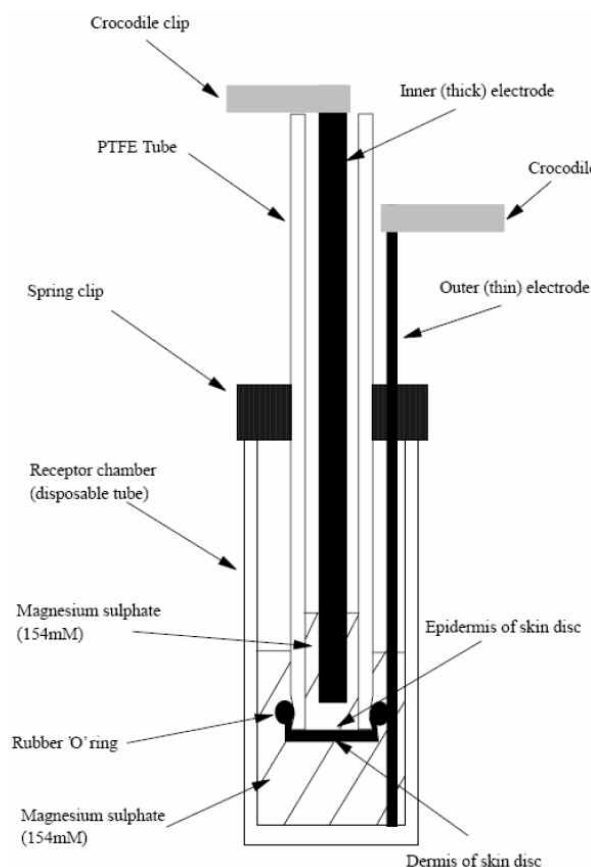
1.1.2. 동물 성별 및 시험 전 준비사항

소형 이발기를 이용해 약 22 일령 수컷 또는 암컷 랫드(Wistar 또는 유사종)의 등 부위와 측면의 털을 깎는다. 동물을 조심스럽게 닦고, 털을 깎은 부분은 항생제 용액(예, 미생물 성장을 억제하기 위한 적절한 농도의 Streptomycin, Penicillin, Chloramphenicol 및 Amphotericin 등을 함유한 용액)으로 소독한다. 그 후 3 일 ~ 4 일이 경과되면 항생제를 다시 처리 한 후, 3 일이 지나기 전에 실험에 사용한다.

1.2. 시험장치

피부 TER 시험장치 (그림 1)와 시험에 사용된 PTFE (Polytetrafluoroethylene), Receptor tube, 전극의 크기(그림 2)는 아래와 같다.

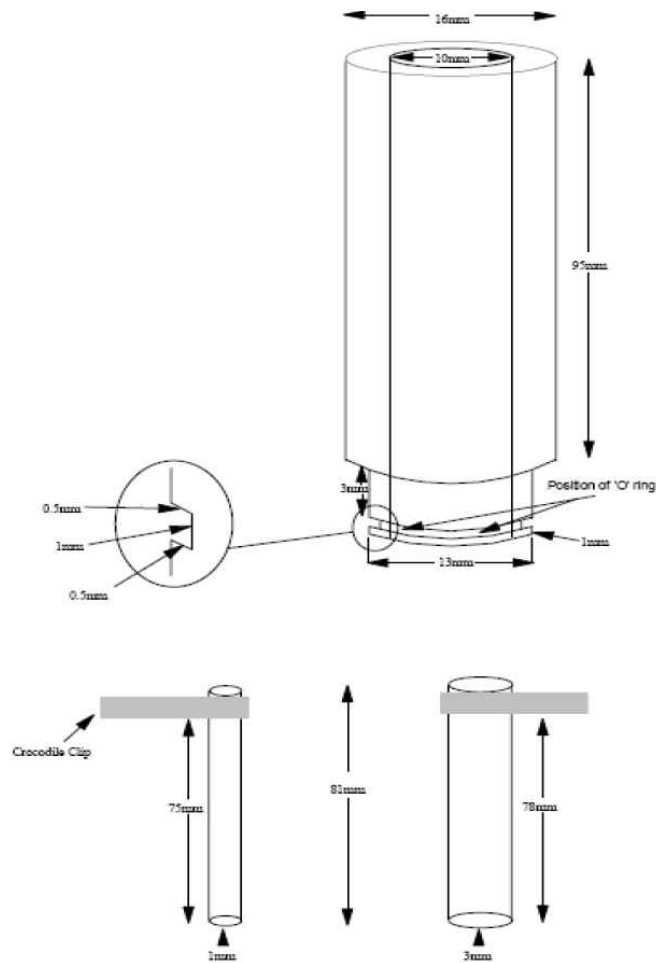
그림 1. 피부 TER 시험을 위한 장치



(가장 위에서 시계 방향으로)

- Crocodile 클립
- 내부(두꺼운) 전극
- 외부(얇은) 전극
- 피부 조각의 표피 부분
- 피부 조각의 진피층 부분
- MgSO_4 (154 mM)
- 고무 'O' 링
- MgSO_4 (154 mM)
- Receptor 챔버 (일회용 튜브)
- 스프링 클립
- PTFE 튜브

그림 2. 사용된 PTFE(Polytetrafluoroethylene) 및 Receptor tube, 전극의 크기



본 장비에서 중요한 사항은 다음과 같다.

- PTFE 튜브의 내부 직경

- PTFE 튜브 및 Receptor 튜브에 관련된 전극의 길이, 전극이 피부조각에 닿지 않아야 하며, $MgSO_4$ 용액에 들어가는 전극의 표준 길이

- PTFE 튜브에서 Receptor 튜브 내 $MgSO_4$ 용액 양의 비율이 그림 2에 나타난 바와 같아야 함

- 피부 조각을 PTFE에 잘 고정하여, 피부의 특성에 대한 실제 전기저항 값의 측정이 이루어지도록 해야 함

1.3. 피부 평면조각(Disc)의 준비

1.3.1. 28 일령 ~ 30 일령 시험동물의 등외측쪽(Dorso-lateral)에서 20 mm 직경의 피부

조각을 떼어낸 후 피하 지방을 제거한다. 저장한 피부를 사용할 경우에는 음성 및 양성 대조군의 결과가 즉시 채취한 피부를 사용할 때와 동일하게 나타났을 때, 피부를 일정 기간 저장한 후 사용할 수 있다.

1.3.2. 피부조각을 PTFE(Polytetrafluoroethylene) 튜브의 끝에 올려놓고, 이 때 표피가 튜브에 확실히 닿도록 한다. 고무로 된 'O' 링을 튜브 끝에 놓아 피부를 고정하고 링 밖으로 나와 남는 부분은 잘라낸다. 고무 'O' 링을 Petroleum jelly로 조심스럽게 고정시킨다. 튜브를 $MgSO_4$ 용액(154 mM)이 들어있는 Receptor chamber 안에 스프링 클립으로 고정시킨다(그림 1). 피부조각은 $MgSO_4$ 용액에 완전히 잠기도록 한다. 관과 'O' 링의 크기는 그림 2를 참고한다.

1.3.3. 본 시험 전에 각 피부 조각에 대하여 전기 저항성을 우선 확인한다. 두개의 피부 조각의 전기 저항 값이 10 k Ω 보다 크게 나타나는 경우 시험에 사용할 수 있지만, 10 k Ω 이하인 경우에는 해당 동물에서 떼어낸 피부 조각을 사용할 수 없다.

1.4. 시험물질

액체 시험물질의 투여량은 150 μ L로 한다. 각 시험마다 양성 및 음성대조군을 두는데, 양성대조군은 10 M 염산(HCl)을 사용하고, 음성대조군은 식염수를 사용한다.

2. 시험방법

2.1. 원리

피부 디스크의 상피부분에 시험물질을 24 시간까지 노출시키는데, 정상적인 각질층 구조 및 방어기능을 손상시키는 부식성 물질은 역치 이하의 경피성 전기저항(TER)의 감소가 나타난다. 랫드의 TER cut-off value는 5 k Ω 이고, TER이 5 k Ω 부근에서 관찰되는 경우 염료를 이용하여 확인시험을 할 수 있다 (염료결합시험 방법은 OECD 테스트 가이드라인 TG 430의 21 항 ~ 24 항을 참조).

2.2. 시험물질투여

각 대조군 및 투여군은 세 개 씩의 피부 조각을 사용하여 시험물질을 20 °C ~ 23 °C 범

위에서 노출시킨다. 24 시간 후에 30 °C 이하의 수돗물로 시험물질을 제거한다.

2.3. 피부전기저항성 검사

2.3.1. 전기 저항을 측정하기 전, 충분한 양의 70 %에탄올로 표피를 처리하여 피부의 표면장력을 감소시킨다. 수초 후 에탄올을 제거하고 관과 조직에 $MgSO_4$ (154 mM) 용액 3 mL를 첨가하여 수분을 공급한다.

2.3.2. Data bridge 전극(Electrodes)을 피부 조각의 양쪽에 놓고, 피부조각 당 저항성을 $k\Omega$ 으로 측정한다(그림 1). Crocodile clip 밑에 노출된 전극의 면적 및 길이는 그림 2에 나타난 바와 같다. 저항치를 측정하는 동안 내부 전극에 부착된 클립을 PTFE 튜브의 상부에 두고, $MgSO_4$ 용액에 일정한 길이가 잠겨있을 수 있도록 한다. 바깥쪽의 전극은 Receptor chamber의 안쪽에 두고 바닥에 닿을 수 있게 한다. 스프링 클립과 PTFE 튜브 사이의 간격은 저항 값의 측정에 영향을 줄 수 있기 때문에 간격을 일정하게 유지한다. 마찬가지로, 내부 전극과 피부조각 사이의 거리도 최소한으로(1 mm ~ 2 mm)일정하게 유지한다.

2.3.3. 피부 표피면에 시험물질이 남아있을 때는 저항 값이 20 $k\Omega$ 이상으로 측정될 수 있다. 이 때, PTFE 튜브를 장갑을 낀 손으로 막고 10 초 정도 흔들어 남은 시험물질을 제거한 후, 새로운 $MgSO_4$ 을 튜브에 넣은 후 새로운 저항 값을 측정한다.

2.4. 결과 및 피부전기저항성 평가

2.4.1. 양성 및 음성 대조군 결과가 허용 범위 내인 경우

평균 TER을 결과로 사용한다.

- 음성 및 양성 대조군의 저항 허용 범위 값 -

대조군	시험물질	저항 범위($k\Omega$)
양성	10 M 염산	0.5 ~ 1.0
음성	증류수	10 ~ 25

2.4.2. 염료결합시험 시 양성 및 음성 대조군 결과가 허용 범위 내인 경우

평균 염료 결합 값을 결과로 사용한다.

- 음성 및 양성 대조군의 염료 허용 함유량 -

대조군	시험물질	염료 함유량 범위($\mu\text{g}/\text{disc}$)
양성	10 M 염산	40 ~ 100
음성	증류수	15 ~ 35

2.4.3. 다음과 같은 경우, 피부 부식성이 없는 시험물질로 간주한다.

- 평균 TER 값이 5 k Ω 보다 큰 경우
- 평균 TER 값이 5 k Ω 이하이고, 피부 조직에서 명백한 손상이 관찰되지 않고, 평균 피부 염료 함유량이 10 M 염산 처리한 양성 대조군에서 얻어진 염료 함유량 보다 유의적으로 낮은 경우

2.4.4. 다음과 같은 경우, 피부 부식성이 있는 시험물질로 간주한다.

- 평균 TER 값이 5 k Ω 이하이고, 피부 디스크에 눈에 띄는 손상이 있는 경우
- 평균 TER 값이 5 k Ω 이하이고, 피부 조직에서는 눈에 띄는 손상이 관찰되지 않지만, 평균 피부 염료 함유량이 10 M 염산 처리한 양성 대조군에서 얻어진 염료 함유량 이상인 경우

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

시험물질에 대한 저항 값 (k Ω), 평균 염료 함유량($\mu\text{g}/\text{disc}$), 음성 · 양성 대조군의 결과에 대한 반복 실험 결과를 모두 포함하여 개별 값, 그리고 평균을 표로 요약하여 나타낸다(개별적 데이터는 평균 \pm 표준편차 : S.D.로 나타낸다).

2. 시험결과의 보고

시험보고는 다음의 항목을 포함한다.

- 2.1. 시험기관의 명칭 및 소재지
- 2.2. 시험책임자 및 담당자 성명

2.3. 시험 및 대조 물질 정보

- (1) IUPAC 또는 CAS 번호와 같은 화학명
- (2) 시험물질의 순도 또는 실험용 혼합물(무게 %로 나타냄)의 배합, 물리적 특성 및 순도
- (3) 시험의 수행과 관련된 시험물질의 물리적 상태(기체, 고체, 액체 등), pH, 안정성, 수용성 등의 물리화학적 특성

2.4. 사용된 동물종/성별/공급원의 환경조건/피부 조직 채취에 대한 구체적인 사항

2.5. 시험조건

- (1) 시험 장비를 위한 표준곡선
- (2) 염료 결합 시험 수행 시 표준곡선
- (3) TER 측정을 위해 사용한 세부적인 시험절차
- (4) 염료 결합 시험 수행의 세부적인 시험절차(필요한 경우)
- (5) 변형된 시험 절차의 세부사항(있는 경우)
- (6) 평가범주에 대한 세부사항

2.6. 각 동물 및 각 개체(피부 조각)에 대하여 TER 및 염료 결합 시험(수행한 경우)의 결과

2.7. 결과에 대한 고찰 및 결론

제21항 생체의 피부 부식성시험(인체 피부모델시험)

I. 개요

1. 목적

이 시험은 인체피부모델을 이용한 생체외(*In vitro*) 피부 부식성 시험으로서, 화학 물질 또는 혼합물의 피부부식에 대한 영향을 평가하는데 그 목적이 있다. 이 시험은 화학물질 또는 혼합물을 세계분류표시조화(UN GHS)의 분류법에 따라 부식성 물질과 비부식성 물질로 구분하는데 필요한 정보를 제공한다.

* UN GHS; United nations globally harmonized system

2. 용어정의

2.1. 피부 부식성

시험물질을 일정시간 동안 피부조직에 노출시켰을 때 표피에서 진피까지 육안으로 관찰 가능한 조직 괴사 반응. 시험물질의 노출이 중단되어도 회복이 불가능한 손상을 의미하며 시험물질을 생체내 (*In vivo*) 피부조직에 4 시간까지 처리했을 때는 궤양, 출혈, 혈액딱지가 형성되며 14 일 이후에는 피부 표백, 탈모 및 상흔이 유발 되는 것을 의미함. =단, 확실하지 않은 손상에 대해서는 조직병리학적 검사를 수행할 필요가 있음.

2.2. 세포 생존율

대조군의 생존 대비 시험물질 처리군의 생존을 비율 (%)로 나타낸 것. 세포의 생존여부는 세포의 전체 활성을 측정하는 인자를 이용하여 측정하며 유효성이 입증된 정량적 방법을 사용함. 가장 널리 사용하는 방법은 정확성 및 재현성이 입증된 MTT¹⁾환원법이며 적정성이 검증된 다른 방법을 사용할 수도 있음.

¹⁾ MTT; 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Thiazolyl blue

2.3 반수치사시간 (ET₅₀)

일정한 시험물질의 농도에서 세포의 생존율을 50 % 감소시키는 데 필요한 시간

2.4 반수치사농도 (IC₅₀)

일정한 시간에서 세포의 생존율을 50 % 감소시키는 데 필요한 시험물질의 농도

II. 시험

1. 원리

3 차원 인체피부모델에 시험물질을 적용하여, 특정 노출시간동안 세포의 생존율을 측정함으로써 부식성 화학물질을 확인할 수 있다. 인체피부모델을 이용한 부식성 시험의 원리는 부식성 물질이 확산 또는 침식에 의해 각질층을 통과하여 하층의 피부 조직에 비가역적 세포독성을 나타냄으로써 세포 생존율을 저하시키는 정도를 측정하는 것이다. 이때 세포독성 측정은 일반적으로 MTT법을 이용한다.

2. 시험의 준비

2.1. 인체피부모델

(1) 종류

생체의 피부 자극성 시험을 수행하기 위해서는 인체피부모델을 사용한다. OECD에서 그 적정성이 검증된 모델로서 상업적으로 구입이 가능한 EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™ 및 LabCyte EPI 등을 시험법에 사용하며, 이외의 인체피부모델을 사용하여 화학물질 등록 등 규제관리의 목적으로 피부자극성 시험결과를 생산하고자 할 때는 해당 인체피부모델에 대한 신뢰성, 정밀성, 제한점 등에 관한 품질보증 및 검증자료를 제출하여야 한다.

(2) 일반조건

일반적으로 인체피부모델을 제작하기 위해서는 비형질전환(Non-transformed) 케라틴세포를 사용하여야 한다. 피부모델은 각질층 (Stratum corneum) 아래에 다수의 표피 세포층 (Basal layer, stratum spinosum, stratum granulosum)이 존재하여야 하며, 각질층은 필수지방층을 가진 여러 층으로 구성되어 독성물질 마커 (Sodium

dodecyl sulfate, SDS 또는 Triton X-100)의 침투를 방지하기 위해 견고한 기능적 장벽을 가진 구조라야 한다. 또한 미생물 등(박테리아, 바이러스, 미코플라즈마, 곰팡이 등)에 의해 오염이 되지 않아야 한다.

(3) 기능조건

- **생존율** : 인체피부모델의 생존율은 MTT법으로 측정하며 이때 시험물질을 처리하지 않은 음성대조군에 대한 MTT법을 적용하였을 때 흡광도 최고치와 최저치에 대한 기준은 아래 표. 1을 만족하여야 한다. 음성대조군의 세포 생존율은 시험물질 노출기간 동안 안정적으로 유지되어야 한다. MTT법에 사용되는 용매의 흡광도는 충분히 낮아서 세포생존율의 측정을 방해하지 않아야 하며 용매만의 흡광도는 0.1 이하여야 한다.

표. 1 음성대조군에 대한 MTT법에서의 흡광도 범위

	최저값 기준	최고값 기준
EpiSkin™ (SM)	≥ 0.6	≤ 1.5
EpiDerm™ SCT (EPI-200)	≥ 0.8	≤ 2.8
SkinEthic™ RHE	≥ 0.8	≤ 3.0
epiCS®	≥ 0.8	≤ 2.8

- **방어벽 기능** : 인체피부모델의 각질층은 세포독성 지표물질(SDS 또는 Triton X-100)이 빠르게 투과하지 않을 정도의 충분히 견고한 방어벽 기능을 가지고 있어야 한다. 이때 방어벽 기능의 정도는 IC₅₀ 이나 ET₅₀으로 나타낼 수 있는데 그 기준은 표. 2와 같다.

표. 2 인공피부모델의 적정성 판단기준

인공피부모델	시험조건	최저값 기준	최고값 기준
EpiSkin™	SDS로 18시간 처리	IC ₅₀ = 1.0 mg/mL	IC ₅₀ = 3.0 mg/mL
EpiDerm™	1% Triton X-100 처리	ET ₅₀ = 4.0 hours	ET ₅₀ = 8.7 hours
SkinEthic™	1% Triton X-100 처리	ET ₅₀ = 4.0 hours	ET ₅₀ = 10.0 hours
epiCS®	1% Triton X-100 처리	ET ₅₀ = 2.0 hours	ET ₅₀ = 7.0 hours

- **재현성** : 오랜 기간에 걸쳐 음성대조물질 및 양성대조물질에 대한 시험결과가 시험기관에서 재현성 있게 확인되어야 한다. 음성 대조물질 (비부식성물질) 및 양성 대조물질(부식성물질)의 목록은 표. 3과 같다.

표. 3 인체피부모델의 기능 재현성을 확인하기 위한 대조물질의 목록

UN GHS 분류 (<i>In vivo</i>) ¹⁾		화학물질명
부식성	1A	Acrylic acid (79-10-7) Bromoacetic acid (79-08-3) Boron trifluoride dihydrate (13319-75-0) Phenol (108-95-2)
	1B and 1C	Glyoxylic acid monohydrate (563-96-2) Lactic acid (598-82-3) N,N-Dimethylbenzylamine (103-83-3) Sodium bisulfate monohydrate (10034-88-5)
비부식성	NC	Phenethyl bromide (103-63-9) 4-Amino-1,2,4-triazole (584-13-4) 4-(methylthio)-benzaldehyde (3446-89-7) Lauric acid (143-07-7)

¹⁾ OECD TG 404에 따라 수행한 *In vivo* 시험결과임

- **품질관리** : 본 시험의 적정성 확보를 인체피부모델은 공급자가 제시하는 각 품질기준에 적합할 때에만 사용하여야 한다. 즉, 인체피부모델의 구조, 생존율 및 방어벽 기능 등이 품질기준에 적합하여야 한다. 품질기준은 IC₅₀ 및 ET₅₀로 판단하며 각 인체피부모델의 기준은 표. 2에서 제시된 바와 같다.

3. 시험방법

3.1. 인체피부모델 배양

인체피부모델의 배양은 공급자의 프로토콜에 따른다. 10 % 혈청 및 항생제를 포함하여 필요한 영양소가 적절히 함유된 배양배지를 사용하며, 피부모델에 따라 실온 또는 36 °C 및 5 % CO₂ 가 유지되는 세포 배양기에서 배양한다. 시험에 사용할 인체피부모델은 시험물질을 투여하기 전에 일정 시간동안 해당 실험실의 세포배양기에서 전배양한다.

3.2. 시험물질 노출

시험물질은 액체 및 고체 모두 적용이 가능하며 각 노출시간에 대해 대조물질과 시험물질마다 최소 2 개 이상의 인체피부를 (n = 2) 사용한다. 각 시험마다 양성대조군과 음성대조군을 둔다. 시험물질의 적용방법은 인체피부모델에 따라 조금씩 차이가 있으며 부록 1에 제시된 바 와 같다. 시험물질은 인체피부모델에 적정 분량을 고르게 적용하며 적정 분량 이상의 과량을 적용하여서는 아니 된다 (예, 최소 70 µL/cm² 또는 30 mg/cm²). 고체물질을 적용할 경우 피부모델에 효과적으로 접촉할 수 있도록 탈이온수나 증류수를 피부위에 도포해 준다. 필요한 경우, 고체는 시험 전에 분말로 분쇄하여 사용한다. 시험물질 노출이 종료되면 피부모델을 완충액이나 0.9 % NaCl로 세척한다. 매 시험마다 양성 및 음성대조군을 두는데, 양성대조군은 빙초산(Glacial acetic acid) 또는 8 N 수산화칼륨(KOH)을 사용하며, 음성대조군은 0.9 % NaCl 또는 증류수를 사용한다. 인체피부모델에 대한 시험물질의 노출은 3 분 노출과 60 분 노출의 2 개 노출군으로 나누어 시험한다. 다만, EpiSkin™의 경우 추가로 240 분 노출군을 둔다.

3.3 생존율 측정

세포 생존율 측정은 유효성이 입증된 정량적 방법을 사용할 수 있다. 가장 널리 사용하는 방법은 MTT법이며 정확성 및 재현성이 입증된 다른 방법을 적용하는 것도 가능하다. MTT법은 시험물질 처리 및 후배양이 끝난 인체피부모델에 적절한 농도(예, 0.3 ~

1 mg/mL)의 MTT 용액에 넣고 3 시간 동안 CO₂ 세포 배양기에서 배양한 후, 침전된 청색의 포르마잔 산물을 이소프로판올 용매(Isopropanol)로 추출하고 570 nm 파장에서 흡광도를 측정한다. 시험물질이 MTT 등 발색제와 직접 작용하여 흡광도 측정에 영향을 줄 경우에는, 시험물질에 의한 방해 작용을 보정하기 위하여 추가적인 대조군을 사용한다. 세포생존율은 음성 대조군의 흡광도에 대한 시험물질 처리군의 흡광도의 백분율로 구한다.

3.4 판정

(1) 시험의 적정성

음성대조군의 흡광도 범위는 표. 1의 기준에 적합해야 하며 각 인체피부모델의 적정성은 표. 2를 만족해야 한다. 양성대조군을 처리한 경우 세포독성이 확인되어야 하며 동일 시험물질 및 동일 노출조건에서 처리된 2 개의 인체피부모델간의 결과 값이 30 % 이상 차이가 나지 않아야 된다. 이상의 기준을 만족하지 못할 경우에 그 시험은 다시 수행되어야 한다. 시험결과가 부식성과 비부식성을 구분하기에 명확한 경우에는 시험물질 노출당 2 개의 인체피부모델 (n = 2)을 사용하면 충분하다. 그러나 시험결과가 판정기준값 근처에 몰려있어서, 각각의 결과가 부식성과 비부식성으로 서로 다른 결과를 초래하거나, 또는 평균값이 판정기준 값의 $\pm 5\%$ 의 범위에 존재할 경우에는 두 번째의 시험을 수행하며 두 번째의 시험에서도 같은 결과가 나올 경우 세 번째의 시험을 수행하도록 한다.

(2) 판정기준

부식성 및 비부식성에 대한 판정기준은 인체피부모델에 대한 시험으로부터 산출된 세포생존율에 따라 아래 각 인체피부모델별 판정기준에 따른다.

표 4. EpiSkin을 사용한 경우의 판정기준

판정		생존율
부식성	등급 1A	3분 노출시 35 % 미만
	등급 1B 및 1C	3 분 노출에서 35 % 이상 이면서 60 분 노출에서 35 % 미만 또는 60분 노출에서 35 % 이상 이면서 240분 노출에서 35 % 미만
비부식성		240 분 노출에서 35 % 이상

표 5. EpiDerm 및 SkinEthic을 사용한 경우의 판정기준

판정		생존율
부식성	등급 1A	3 분 노출에서 50 % 미만
	등급 1B 및 1C	3 분 노출에서 50 % 이상 이면서 60분 노출에서 15 % 미만
비부식성		3 분 노출에서 50 % 이상 이면서 60분 노출에서도 15 % 이상

표 6. epiCS를 사용한 경우의 판정기준

판정	생존율
부식성 (Category 1)	3 분 노출에서 50 % 미만 또는 3 분 노출에서 50 % 이상 이면서 60 분 노출에서 15 % 미만
비부식성	3 분 노출에서 50 % 이상 이면서 60 분 노출에서도 15 % 이상

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

시험물질의 부식성 및 비부식성을 평가하기 위해 시험군 및 음성, 양성 대조군의 결과를 인체피부모델에 따라 각각의 개별값 및 평균값으로 표에 요약하여 나타낸다(생존율 데이터는 평균 \pm 표준편차로 나타낸다). 시험에 사용한 인체피부모델의 종류에 따라 시험을 수행하여 얻은 세포생존율 결과 값을 바탕으로 표. 4 ~ 표. 6의 판단기준을 적용하여 부식성 및 비부식성 물질을 판정한다.

2. 시험결과의 보고

시험보고는 다음의 항목을 포함한다.

2.1. 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2. 시험책임자 및 담당자 성명

2.3. 시험 및 대조 물질 정보

(1) IUPAC 또는 CAS 화학명

(2) 시험물질의 순도 또는 실험용 혼합물(무게 %로 나타냄)의 배합, 물리적 특성 및 순도

(3) 시험의 수행과 관련된 시험물질의 물리적 상태(기체, 고체, 액체 등), pH, 안정성, 휘발성, 수용성 등의 물리화학적 특성

(4) 시험 이전에 시험/대조 물질의 처리(필요한 경우: 예, 가온 또는 분쇄 등)

(5) 보관조건

2.4 사용된 피부 모델 및 시험법의 적정성에 대한 근거

2.5. 시험조건

(1) 사용한 인체피부모델 (배치번호 포함)

(2) 세포 생존율을 확인하기 위해 사용한 장비(예, Spectrophotometer)에 대한 보정정보

(3) 사용한 피부 모델에 대한 유효성을 포함한 모든 정보

- 생존율, 방어벽 기능, 형태, 재현성/예측성, 품질보증 데이터

(4) 사용한 시험결과에 대한 세부사항

- 노출후 세척정보, 세포생존율 측정에 사용한 흡광도 파장

(5) 사용된 시험용량, 노출시간 및 온도

(6) 시험물질당, 노출시간당 사용한 인공피부모델 수

(7) 변형된 시험 절차의 세부사항(있는 경우)

(8) 인체피부모델을 이용한 시험성적에 대한 과거의 참고자료

- 품질보증 인정여부, 음성대조 및 양성대조 값의 적정성 여부, 각 인공피부모델 반복 투여값의 차이 등

(9) 평가범주에 대한 세부사항

2.6. 시험의 결과

(1) 개별 시험 샘플에 대한 데이터 표

(2) MTT반응을 간섭하는 시험물질의 경우 이에 대한 대조 시험

(3) 시험지침에서 제시되어 있지 않은 다른 반응

(4) 시험결과에 대한 판정

2.7. 결과에 대한 고찰

2.8. 결론

<부록 > 각 피부세포 별 피부 부식성 주요 시험 방법

	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
면적	0.38 cm ²	0.63 cm ²	0.5 cm ²	0.63 cm ²
피부모델 수	노출시간 당 최소 2 개	노출 시간 당 2 개 ~ 3 개	노출 시간 당 최소 2 개	노출 시간 당 3 개
노출용량과 적용방법	<p>- 액체 및 점성체 ; 50 μL \pm 3 μL (131.6 μ L/cm²)</p> <p>- 고체 ; 20 mg \pm 2 mg (52.6 mg/cm²), 0.9 % NaCl용액 100 μL \pm 5 μL 사용</p> <p>- 왁스상/끈적거리는 물질 ; 50 mg \pm 2 mg (131.6 mg/cm²), 나일론 망 사용</p>	<p>- 액체 ; 50 μL (79.4 μL/cm²), 나일론 망 사용 (나일론 망을 사용하지 않아도 무방하며 사전 시험을 통해 결정)</p> <p>- 반고체 ; 50 μL (79.4 μL/cm²)</p> <p>- 고체 : 25 mg (39.7 mg/cm²), H₂O 25 μL(또는 그 이상) 사용</p> <p>- 왁스상 : 15 μL의 H₂O로 적신 세포모델위에 약 8 mm 지름의 디스크 모양으로 평평하게 적용</p>	<p>- 액체 및 점성체 : 40 μL \pm 3 μL (80 μL/cm²), 나일론망 사용 (나일론 망을 사용하지 않아도 무방하며 사전 시험을 통해 결정)</p> <p>- 고체 : 20 mg \pm 3 mg(40 mg/cm²), H₂O 20 μL \pm 2 μL 사용</p> <p>- 왁스상/끈적거리는 물질 : 20 mg \pm 3 mg (40 mg/cm²), 나일론 망 사용</p>	<p>- 액체 : 50 μL (79.4 μL/cm²), 나일론 망 사용 (나일론 망을 사용하지 않아도 무방하며 사전 시험을 통해 결정)</p> <p>- 반고체 : 50 μL (79.4 μL/cm²)</p> <p>- 고체 : 25 mg (39.7 mg/cm²), 25 μL 또는 그 이상의 H₂O 사용</p> <p>- 왁스 : 15 μL H₂O로 적신 세포모델위에 약 8 mm 지름의 디스크모양으로 평평하게 적용</p>

	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
시험물질과 MTT의 직접반응 여부 확인시험	<p>시험물질이 액체인 경우 50 μ L, 고체인 경우 20 mg을 2 mL MTT 용액(0.3 mg/mL)과 혼합한 후 37 $^{\circ}$C로 180 분 \pm 5 분간 5 % CO₂ 인큐베이터에서 배양 (세포가 없는 상태에서의 발색여부를 확인하고자 함)</p> <p>→ 용액이 청색/자색으로 변한 경우, 대사기능이 없는 죽은 세포에서의 발색정도와 실제 생존세포에서의 발색정도를 비교하여 생존율을 보정하도록 함</p>	<p>시험물질이 액체인 경우 50 μ L, 고체인 경우 25 mg을 1 mL MTT 용액 (1 mg/mL)과 혼합한 후 37 $^{\circ}$C로 60 분간 5 % CO₂ 인큐베이터에서 배양 (세포가 없는 상태에서의 발색여부를 확인하고자 함)</p> <p>→ 용액이 청색/자색으로 변한 경우, 대사기능이 없는 죽은 세포에서의 발색정도와 실제 생존세포에서의 발색정도를 비교하여 생존율을 보정하도록 함</p>	<p>시험물질이 액체인 경우 40 μ L, 시험물질이 고체인 경우 20 mg을 1 mL MTT용액 (1mg/mL)과 혼합한 후 37 $^{\circ}$C로 180 분 \pm 5 분간 5 % CO₂ 인큐베이터에서 배양 (세포가 없는 상태에서의 발색여부를 확인하고자 함)</p> <p>→ 용액이 청색/자색으로 변한 경우, 대사기능이 없는 죽은 세포에서의 발색정도와 실제 생존세포에서의 발색정도를 비교하여 생존율을 보정하도록 함</p>	<p>시험물질이 액체인 경우 30 μ L, 고체인 경우 25 mg를 1 mL MTT용액 (1 mg/mL)과 혼합한 후 37 $^{\circ}$C로 60 분 간 5 % CO₂ 인큐베이터에서 배양 (세포가 없는 상태에서의 발색여부를 확인하고자 함)</p> <p>→ 용액이 청색/자색으로 변한 경우, 대사기능이 없는 죽은 세포에서의 발색정도와 실제 생존세포에서의 발색정도를 비교하여 생존율을 보정하도록 함</p>
정색반응 저해여부 사전확인	<p>10 μ L(액체인 경우) 또는 10 mg(고체인 경우) 의 시험물질을 90 μ L H₂O와 실온에서 15 분간 혼화</p> <p>→ 용액의 색이 변하면, 생존세포에서의 발색정도 (MTT없는 상태)를 확인하고 생존율을 보정하도록 함</p>	<p>50 μ L(액체인 경우) 또는 25 mg (고체인 경우)의 시험물질을 300 μ L H₂O와 37 $^{\circ}$C의 5 % CO₂ 인큐베이터에서 60 분간 혼화</p> <p>→ 용액의 색이 변하면, 생존세포에서의 발색정도 (MTT없는 상태)를 확인하고 생존율을 보정하도록 함</p>	<p>40 μ L (액체인 경우) 또는 20 mg (고체인 경우)의 시험물질을 300 μ L H₂O와 실온에서 60 분간 혼화</p> <p>→ 용액의 색이 변하면, 생존세포에서의 발색정도 (MTT없는 상태)를 확인하고 생존율을 보정하도록 함</p>	<p>30 μ L (액체인 경우) 또는 25 mg (고체인 경우)의 시험물질을 300 μ L H₂O와 37 $^{\circ}$C의 5 % CO₂ 인큐베이터에서 60 분간 혼화</p> <p>→ 용액의 색이 변하면, 생존세포에서의 발색정도 (MTT없는 상태)를 확인하고 생존율을 보정하도록 함</p>
노출 시간 및 온도	3 분, 60 분 \pm 5 분 240 분 \pm 10분 환기 가능 실온 (18 $^{\circ}$ C ~ 28 $^{\circ}$ C)	실온에서 3 분, 37 $^{\circ}$ C의 5 % CO ₂ 인큐베이터에서 60 분	실온에서 3 분, 37 $^{\circ}$ C의 5 % CO ₂ 인큐베이터에서 60 분	실온에서 3 분, 37 $^{\circ}$ C의 5 % CO ₂ 인큐베이터에서 60 분
세척	25 mL 인산완충용액 (2 mL씩으로 세척)	인산완충용액으로 약 20 회 정도 부드럽게 세척	인산완충용액으로 약 20 회 정도 부드럽게 세척	인산완충용액으로 약 20 회 정도 부드럽게 세척

	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
음성대조군	50 μ L NaCl용액 (9 g/L) 모든 노출 시간마다 시험	50 μ L H ₂ O 모든 노출 시간마다 시험	40 μ L H ₂ O 모든 노출 시간마다 시험	50 μ L H ₂ O 모든 노출 시간마다 시험
양성대조군	50 μ L 빙초산 4 시간 노출경우에 만 시험	50 μ L 8 N KOH 모든 노출 시간마다 시험	40 μ L 8 N KOH 모든 노출 시간마다 시험	50 μ L 8 N KOH 모든 노출 시간마다 시험
MTT 용액	2 mL 0.3 mg/mL	300 μ L 1 mg/mL	300 μ L 1 mg/mL	300 μ L 1 mg/mL
MTT 배양 시간 및 온도	37 ℃, 5% CO ₂ 인큐베이터에서 180 분 \pm 15 분	37 ℃, 5 % CO ₂ 인큐베이터에서 180 분	37 ℃, 5 % CO ₂ 인큐베이터에서 180 분 \pm 15 분	37 ℃, 5 % CO ₂ 인큐베이터에서 180 분
추출 용매	500 μ L의 산성이소프로판올 (0.04 N HCl in isopropanol)	2 mL 이소프로판올	1.5 mL 이소프로판올	2 mL 이소프로판올
추출 시간 및 온도	빛 차단 후, 실온에서 하룻밤	실온에서 진탕 없이 하룻밤 또는 실온에서 120 분 간 진탕(\sim 120 rpm)	실온에서 진탕 없이 하룻밤 또는 실온에서 120 분 간 진탕(\sim 120 rpm)	실온에서 진탕 없이 하룻밤 또는 실온에서 120 분 간 진탕(\sim 120 rpm)
OD (흡광도 값)	570 nm (545 nm \sim 595 nm) reference filter 없이 측정	570 nm (or 540 nm) reference filter 없이 측정	570 nm (540 nm \sim 600 nm) reference filter 없이 측정	540 nm \sim 570 nm reference filter 없이 측정

제22항 발암성시험

I. 개요

1. 목적

본 시험은 시험물질을 시험동물의 거의 전생애 기간 동안 연속적으로 반복 투여한 후 표적기관에서의 발암 유무를 확인하는데 그 목적이 있다.

2. 용어 정의

2.1 발암성

적정 경로를 통하여 노출되었을 때 시험동물에 신생물을 유발시키는 화학물질의 성질

2.2 용량 (Dose)

투여된 시험물질의 양. 일반적으로 단위는 시험동물의 단위무게 (체중) 당 시험물질의 무게 (예 mg/kg)로 표시

2.3 회복군 (Satellite group, Recovery group)

시험물질의 투여 종료 후 시험물질에 기인한 독성증상이 지연, 유지 또는 회복되는 지를 확인하기 위하여 필요시 추가하는 동물군

2.4 위관 투여법 (Gavage)

사료 또는 음용수를 통해 투여하지 않고 위장 튜브 또는 캐놀라를 이용한 강제적인 물질 투여방법

2.5 빈사상태 (Moribund status)

시험물질의 독성에 의하여 시험동물이 죽어가는 상태 또는 생존할 가망이 없는 상태

II. 시험

1. 원리

시험동물의 전생애에 해당하는 기간 동안 여러 용량으로 시험물질을 (일반적으로) 매일 경구 투여 한 후, 동물들의 독성증상과 신생물 병변의 발달에 대해 평가한다.

2. 시험의 준비

2.1 시험동물

- (1) 본 시험에서는 설치류인 랫드가 선호되며 마우스를 사용할 수도 있다. 동일 계통의 동물을 이용하고 화학물질의 감수성 측면에서 선호되는 동물을 사용한다. 생후 8 주 이하의 건강한 수컷과 임신과 출산의 경험이 없는 암컷을 사용 한다.
- (2) 각 시험군과 대조군은 암수 각각 50 마리 이상으로 한다. 동물들은 대조군과 시험군으로 무작위 배정하고, 성별 체중변화는 평균체중의 $\pm 20\%$ 를 초과하지 않도록 한다.
- (3) 개별 동물에게 고유 식별번호를 배정하고, 영구적인 방법으로 표시 한다. 실험전 최소 7 일간 실험실 조건에 순화 시키고 가능한 빨리 투여를 시작 한다. 대조군에 속하는 동물을 시험군과 동일한 방법으로 처치한다.
- (4) 중간 안락사는 12 개월째에 실시하며 신생물 변화 및 진행, 기전에 대한 정보를 기록한다. 중간 안락사 시킬 것으로 예정 한 동물의 수만큼 (보통 암수 각 10 마리) 동물 총 수를 더 준비한다. 보조군은 질병상태 모니터링을 위해 추가하며, 보통 암수 각 5 마리를 준비한다.

2.2 사육조건

사육실은 온도가 $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, 습도가 $30\% \sim 70\%$ 가 유지되도록 한다. 사육은 개별적으로 구별하거나, 소그룹 단위로 나누어 실시한다. 인공조명으로 매 12 시간 간격으로 점멸한다. 사료는 일반적으로 널리 쓰는 것을 사용하며, 음용수는 자유로이 섭취시킨다. 사료의 오염물질 여부에 대해 정기적으로 분석하고, 보고가 끝날 때까지 사료 표본을 보관한다.

3. 시험방법

3.1 시험물질의 투여

- (1) 용량과 반응과의 관계를 알기위하여 투여 용량은 3 단계로 한다.(주 1) 예비시험을 거쳐, 대조군에 비하여 10 %정도의 체중감소가 나타나지만 중독에 의한 사망은 나타나지 않는 양을 최고용량으로 한다. 최고용량에서 보통 공비 2 배 ~ 4 배 간격으로 중간용량과 최저용량을 설정하며 대조군을 둔다. 시험물질을 투여하는데 용매가 사용되면, 대조군에도 시험군에 사용된 최고 용적의 용매를 투여하여야 한다.
- (2) 원칙적으로 경구투여를 하며, 흡입이나 경피투여를 통한 시험도 가능하다. 경구투여시에는 시험물질을 사료나 음용수에 섞어 투여할 수도 있으며 위관 투여법으로도 투여한다. 위관 투여법을 통한 경구투여 시 시험물질을 일정한 시간에 1 일 1 회 투여하며, 시험물질의 양은 시험동물의 크기에 따라 다르나, 일반적으로 최대 1 mL/100g(체중)을 넘지 않도록 한다.
- (3) 사료나 음용수를 통한 투여는 시험물질의 농도가 총 사료의 5 %(w/w) 이하로 제한되며, 시험물질의 사료의 농도 (mg/kg 사료 또는 ppm)와 동물의 체중에 대한 투여량을 주단위로 계산해야 한다.
- (4) 경피 투여의 경우 하루에 최소 6 시간 동안, 주당 7 일, 24 개월 동안 시험물질을 투여 받는다, 흡입 투여는 하루 6 시간 동안 노출하며, 주당 7 일간 수행한다. 시험 계획에 합당한 근거가 제시되면 최대 노출기간은 조절될 수 있다.

3.2 시험기간

시험동물의 거의 전생애에 걸쳐 투여한다. 보통 설치류에 대해 24 개월 이상 투여하는데, 마우스의 특정계통(AKR/J, C3H/J, C57BL/6J 등)은 18 개월이 적합하다. 각 성별에서 생존은 따로 고려하고, 시험의 종결은 저용량 투여군이나 대조군의 생존자 수가 25 % 이하로 떨어졌을 때 고려한다. 고용량 투여군에서만 독성에 의해 조기 사망하는 경우, 시험을 종결할 필요는 없다. 시험 후 이용 가능한 데이터가 통계적으로 유효하지 않더라도 시험기간을 연장하여서는 안 된다.

3.3 관찰사항

- (1) 매일 (주 7일) 하루의 시작과 끝에 일반상태 및 사망의 유무를 관찰하고, 생존율을 산출한다. 위관투여 시, 시험물질 투여 후 효과가 예상되는 최고기를 고려하여 동물의 독성학적 관련이 있는 특이증상에 대해 하루 한번 추가적으로 확인한다. 종양이 발생할 경우에는 위치, 크기, 진행경과, 또는 손에 만져지는 지 등을 기록한다.
- (2) 모든 동물은 시험시작 시 체중을 측정하고, 처음 13 주간 최소 주 1 회, 그 후에는 최소 매달 측정한다. 사료섭취량, 식이효율 및 섭취량은 처음 13 주간은 최소 매주, 그 후에는 최소 매달 측정한다. 섭취량에 대해서는 시험물질을 음료수에 섞어서 투여할 때만 측정한다.

3.4 검사항목

- (1) 혈액학 검사 및 생화학적 검사를 위한 혈액채취 및 뇨분석은 중간안락사 및 시험 종결 시 각 군에서 성별로 최소 10 마리에 대해 수행한다.
- (2) 회복군을 제외 한 시험에 사용한 모든 동물(도중에 사망하거나 안락사한 동물도 포함)을 해부하고 전 장기에 대해 육안관찰을 하고 모든 장기를 적절한 고정액에 보존한다.(주 2) 쌍을 이루는 장기는 두 개 모두 보존한다. 흡입 및 경피 투여에서도 경구에 대한 장기목록 그대로 적용한다.
- (3) 독성병리학적 검사를 실시한다.(주 3)
- (4) 시험 중 사망한 동물에 대해서는 그 원인을 조사한다. 또 일반상태가 매우 나빠져서 죽음에 임박한 동물은 즉시 안락사 시키고 부검한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

- (1) 각 동물의 평가된 모든 시험결과가 표 형태로 요약하여 제시되어야한다. 각 시험군 별 시험시작 시의 동물 수, 인도적 이유로 안락사 시킨 동물의 수, 시험 중 사망하거나 중간안락사 된 동물의 수, 사망하거나 인도적 안락사의 시간, 독성 증상을 보이는 수, 관찰 된 독성 증상에 대한 설명, 독성작용의 발생시기, 기간 및 심각도, 병변을 보인 동물의 수, 병변의 종류 및 각 병변의 종류마다 보이는 동물의 백분율 및 진행경과를 요약한다.
- (2) 요약한 시험결과표에는 병변의 등급 및 독성효과나 병변을 보이는 동물의

평균과 표준편차(연속적인 시험결과에 대한)가 표시되어야 한다. 동시대조군의 시험결과가 예상을 벗어나면 (과거의 대조 시험결과 보유 시) 동일한 시험실에서의 5 년간 생성 된 동일연령 및 계통의 동물에 관한 선행연구 결과가 제출되어야 한다. 수치적 결과는 적절한 통계학적 수법을 이용하여 처리한다.

2. 시험결과의 보고

시험보고서는 다음의 항목을 포함한다.

2.1 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명

2.3 시험물질 정보

- (1) 식별정보 및 CAS 번호
- (2) 물리적 성질과 순도
- (3) 이화학적 성질
- (4) 시험물질의 안정성
- (5) 시험물질의 용매 내에서의 용해도와 안정성

2.4 용매/보조제 종류 및 선정근거

2.5 시험동물

- (1) 동물의 종/계통
- (2) 동물의 수, 주령, 성별
- (3) 구입처, 사육환경, 사료
- (4) 동물 식별 방법
- (5) 동물의 체중범위, 각 그룹별 평균 및 표준 편차를 포함하여, 시험을 시작 및 종료할 때 동물의 개별 중량
- (6) 랫드가 아닐 경우 사용한 동물 종에 대한 근거 및 적정성

2.6 시험조건

- (1) 투여경로 및 투여량 선택근거, 투여에 대한 세부사항
- (2) 결과분석에 사용한 통계적 방법
- (3) 시험물질의 배합 및 사료준비의 세부사항
- (4) 시험물질에서 얻은 농도, 안정성, 균질성에 대한 분석결과
- (5) 흡입 시 코 또는 전신 흡입에 대한 정보

(6) 실제투여량(mg/kg(체중)), 사료/음용수 내 시험물질 농도(mg/kg 또는 ppm)에서 실제 투여량 변환계수

(7) 사료 및 음용수의 품질에 대한 세부사항

2.7 결과

2.7.1 일반독성

- (1) 생존률 정보
- (2) 체중 및 체중변화
- (3) 사료섭취량, 식이효율 계산, 섭취량
- (4) 독성역학 자료 (이용가능 시)
- (5) 검안경, 혈액학적, 임상화학적 검사 (이용가능 시)

2.7.2 임상관찰결과

- (1) 독성증상, 이상의 발생정도 및 점수, 심각도
- (2) 자연발생, 심각도, 임상적 관찰기간 (일시적 혹은 영구적)
- (3) 장기무게 및 그들의 비율 (가능 시)
- (4) 육안 관찰 (이상의 발생정도 및 심각도)

2.7.3 조직학적 관찰결과

- (1) 비 신생물 및 신생물의 조직학적 관찰 결과
- (2) 육안 및 현미경을 통한 관찰 간 조직학적 상관관계
- (3) 모든 처리와 관련한 심각도 등급을 포함한 조직학적 관찰에 대한 세부적인 기술
- (4) 제 3 자의 보고서 검토

2.8 결론

주 1) 투여량 선택 시 고려 사항

- (1) 투여량-반응에서 알려지거나 의심되는 비선형성 또는 변곡점
- (2) 대사유도, 포화에서 독성역학, 용량범위 또는 외부 및 내부 투여량들 사이에서 비선형성 발생 여부
- (3) 전구병변, 효과지표, 생물학적 과정에서 근본적인 작용지표
- (4) 핵심적인 또는 의심되는 작용기작의 양상
- (5) 특별히 확실한 평가가 필요한 용량-반응곡선의 부분 (예 : 예상되는 BMD 또는 의심되는 역치범위)
- (6) 예상되는 인체노출 수준에 대한 고려

주 2) 병리학적 검사를 위한 보존 장기 목록

- (1) 모든 전체적인 병소, 심장, 췌장, 위(분문동, 선위), 부신, 회장, 공장, 부갑상선, 말초신경, 고환, 부고환, 대동맥, 뇌 (대뇌, 소뇌, 수질/뇌교 포함), 신장, 뇌하수체, 흉선, 맹장, 눈물샘(눈외), 전립선, 갑상선, 자궁경부, 간, 직장, 응고선 (Coagulating gland), 폐, 침샘, 기도, 결장, 임파절 (표부 및 심부), 주요근육, 골격근, 방광, 십이지장, 유선(암컷필수, 수컷은 해부가능 시), 피부, 눈 (망막 포함), 식도, 척수(3단계 : 경부, 중흉부, 요추), 비장, 질, 담낭 (랫드 외 종에 대해), 난소, 골수 부위 및 신선한 골수흡입, 하르더샘 (Harderian gland)
- (2) 선택사항 ; 치아, 혀, 상기도 (코, 비갑개 및 부비강 포함), 요관, 요도, 관절 포함 대퇴골, 후 신경구, 흉골

주 3) 조직학적 관찰을 위한 조직 목록

- (1) 고용량 투여군 및 대조군의 모든 조직
- (2) 시험도중 사망하거나 중간안락사 된 동물들의 모든 조직
- (3) 종양을 포함하여 현미경으로 이상이 관찰되는 모든 조직
- (4) 고용량 투여군에서 처리와 관련하여 조직적 변화가 관찰된 경우, 모든 다른 용량 투여군에서 모든 동물들에게 관찰된 동일한 조직
- (5) 쌍을 이루는 장기의 경우 (예를 들어 신장, 부신)는 , 장기 둘 다 관찰하여야 함.

제23항 유전독성시험 (박테리아를 이용하는 복귀돌연변이시험)

I. 개요

1. 목적

이 시험은 살모넬라균의 히스티딘 (Histidine) 요구성 변이(His- → His+)와 대장균의 트립토판 (Tryptophan) 요구성 변이(Trp- → Trp+)를 지표로 하여 점돌연변이(Point mutation)를 야기하는 화학물질의 유전독성을 평가하는데 그 목적이 있다.

2. 용어 정의

2.1 복귀돌연변이(Reverse mutation)

히스티딘이나 트립토판을 생합성하지 못하는 돌연변이 박테리아가 시험물질에 의해 각 아미노산의 생합성 기능을 복구하는 현상

2.2 S9

간 균질액을 9,000 g에서 원심분리하였을 때 생성되는 상층액

2.3 대사활성계 (S9 mix)

S9과 대사 효소 활성화에 필요한 보조인자들의 혼합물

2.4 점 돌연변이(Point mutation)

하나의 뉴클레오타이드(Nucleotide)가 변환되어 나타나는 돌연변이 (Mutation)로 DNA 전사(Translation) 단계에서 특정 단백질의 생성을 막거나 변형시키는 것

II. 시험

1. 원리

이 시험은 시험물질에 의한 DNA 염기쌍의 치환, 삽입, 결실과 관련된 점돌

연변이를 찾기 위해 수행되며, 필수아미노산을 합성하는 데 필요한 유전자 기능이 결손된 균주에 시험물질을 처리한 후 그 기능이 회복되는 것을 평가함으로써 화학물질의 유전자 돌연변이 유발성을 판단한다.

2. 시험의 준비

2.1 사용 균주

살모넬라균 *Salmonella typhimurium* ① TA1535, ② TA1537 또는 TA97a 또는 TA97, ③ TA98, ④ TA100, ⑤ TA102 또는 대장균 *Escherichia coli* [WP2 *uvrA* 또는 WP2 *uvrA* (pKM101)]의 최소 5 종의 균주를 사용하며 *S. typhimurium*의 4 종 균주 (① ~ ④)를 포함해야 한다. 시험 균주의 민감성 및 변이원성에 대해 주기적으로 확인하고, 균주를 사용하지 않을 때에는 -70 °C 이하에서 보존한다. 배양 온도는 37 °C가 추천된다. 박테리아 배양은 지수기 후기나 정지상 초기(대략 10^9 개 세포/mL)까지 성장하도록 한다. 정지상 후기의 배양세포를 사용하지 않도록 하며 생존 박테리아가 반드시 고 농도로 존재한 상태에서 시험을 수행하여야 한다.

2.2 시험물질 및 조제

시험물질이 고형인 경우 적절한 용매나 보조제를 이용하여 용해 또는 분산시켜 사용하며, 가능한 박테리아에 노출시키기 직전에 희석하여 사용한다. 액체물질은 시험계에 바로 처리하거나 처리 전에 희석하여 사용한다. 시험물질은 보관기간이 설정된 경우를 제외하고는 가능한 시험 직전에 조제한 것을 사용한다. 시험물질 조제에 사용하는 용매의 선택은 수용성 용매/보조제를 우선적으로 고려한다. 물에서 안정하지 않은 물질을 시험할 때는 무수 유기용매를 사용한다.

시험물질을 용해 또는 분산시키기 위해 사용되는 용매/보조제는 시험물질과 화학적 반응을 일으키지 않아야 하며, 시험균주의 생존과 S9 mix의 활성화에 적합해야 한다. 잘 알려진 용매 또는 보조제 외의 것을 사용하는 경우, 그 적합성을 증명할 수 있는 자료를 첨부하도록 한다. 기체 또는 휘발성 물

질은 밀봉된 용기에서 적절한 방법으로 시험한다.

2.3 배지

적절한 최소한천배지(예, Vogel-Bonner 최소배지 E와 포도당을 함유한 것)와 히스티딘과 바이오틴, 혹은 트립토판을 함유한 상층 한천이 사용된다.

3. 시험방법

3.1 시험물질의 농도

시험물질의 농도단계는 약 $\sqrt{10}$ 의 공비로 5 단계 이상의 농도에서 분석 가능한 결과를 얻을 수 있도록 설정한다. 세포독성이 있는 물질은 예비시험을 통해 복귀돌연변이 콜로니수가 감소하는 명백한 세포독성을 나타내는 농도를 최고 농도로 설정하고, 세포독성이 없는 물질인 경우는 5 mg/plate 또는 5 μ L/plate의 농도를 최고 농도로 한다. 용해도가 낮아 5 mg/plate 또는 5 μ L/plate의 농도까지 실험할 수 없고 세포독성이 없는 물질의 경우, 녹지 않는 농도 1 개 이상을 포함하여 시험한다. 한편, 5 mg/plate 또는 5 μ L/plate 농도 이하에서 세포독성이 있는 물질의 경우, 독성을 나타내는 농도까지 시험하도록 한다. 시험물질에 돌연변이원성을 가진 불순물이 상당량 포함되어 있는 경우에는 5 mg/plate 또는 5 μ L/plates 이상의 농도에서 시험할 수 있다. 시험물질에 의한 세포독성 및 침전물이 발생할 경우, 시험결과에 그 사항을 명시한다.

3.2 대조군

매 시험마다 대사활성계의 유·무에 관계없이 각 군주에 특이적인 양성 및 음성(용매 또는 보조제) 대조군을 포함하도록 한다. 양성대조군은 널리 사용되고 있는 변이원성 유발물질을 사용하도록 하고 적절한 농도를 선택하여야 한다(주 1). 음성대조군은 시험물질을 함유하지 않은 용매 또는 보조제를 시험군과 같은 방법으로 처리한다.

3.3 대사활성계 (S9 mix)

간 효소의 유도제인 아로클로 1254 (Aroclor 1254) 또는 페노바비탈(phenobarbital) 및 β -나프토플라본(β -naphthoflavone)의 혼합물을 랫드에 투여하여 간에서 S9을 조제하고 사용시에는 보조효소 등을 첨가하여 S9 mix를 준비한다. 이때 S9 mix 중 S9의 농도는 5 % ~ 30 % (v/v) 범위에서 사용한다. 필요시 S9 mix를 2 농도 이상 사용할 수도 있다. 대사활성계의 선택과 조건은 사용하는 화학물질의 계열에 따라 달라진다. 아조계 염료(Azo-dyes)와 디아조(diazo) 화합물은 환원성 대사활성계를 사용하는 것이 더 적절하다.

3.4 시험방법

사전배양법(Preincubation method) 또는 평판법(Plate incorporation method)으로 시험물질의 각 농도에 대해서 3 매 이상의 평판을 사용한다. 과학적 근거가 적정할 경우 2 매의 평판을 사용할 수도 있다. 음성대조물질은 원칙적으로 용매를 이용하고, 양성대조물질은 적절한 변이원성 물질을 이용한다. 대사활성계(S9 mix)를 첨가한 시험조건에 있어서도 동일한 방법으로 시험을 실시한다.

모든 배양 평판은 37 °C가 유지되는 인큐베이터에 48 시간 ~ 72 시간 동안 균주를 배양하고 그 후 각 평판의 복귀돌연변이 콜로니 수를 계수한다. 콜로니 수를 측정 할 때 세포독성 및 침전물을 확인하고 기록한다.

(1) 평판법

대사활성계를 첨가하지 않은 평판법에서는 보통 시험물질/시험용액 0.05 mL 혹은 0.1 mL, 신선한 박테리아 배양체 0.1 mL (약 108개 세포) 그리고 무균 완충용액 0.5 mL를 2.0 mL의 상층한천과 혼합한다. 대사활성계를 첨가한 시험에서는, 보통 충분한 양의 S9 (5 % ~ 30 % v/v의 농도범위 내)을 함유한 S9 mix 0.5 mL을 상층한천 2.0 mL 및 박테리아와 시험물질/시험용액과 혼합한다. 각 튜브의 내용물을 잘 혼합한 후 최소한천배지 위에 붓는다. 상층한천배지는 배양 전에 고형화되도록 한다.

(2) 사전배양법

시험물질/시험용액을 시험균주(약 108개 세포를 함유하는) 및 S9 mix와 함께 혼합한 후 (대사활성계를 사용하지 않은 경우 대사활성계 대신 무균완충용액) 보통 20 분 동안(혹은 그 이상) 30 °C ~ 37 °C에서 미리 배양한다. 보통 시험물질/시험용액 0.05 mL 혹은 0.1 mL, 박테리아 0.1 mL, S9 mix 또는 무균완충액 0.5 mL를 상충한천 2.0 mL와 혼합한다. 사전배양시 시험관은 진탕기를 사용하여 폭기 되도록 한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

음성대조물질, 양성대조물질 및 시험물질을 처리한 각 평판의 복귀돌연변이 콜로니의 수에 대한 실측값과 평균값 및 표준편차를 표시한다. 시험물질 노출에 따른 대사활성계 유·무와는 관계없이 최소 1개 이상의 균주에서 각 평판의 복귀돌연변이 콜로니 수가 사용한 농도에서 농도 의존적이거나 하나 이상의 농도에서 재현성 있는 증가를 보일 경우 양성으로 판정한다.

명확한 양성 결과의 경우, 확인시험은 요구되지 않지만 결과를 판단하기 어려울 때는 시험조건을 변경하여 확인시험을 진행하도록 한다. 한편, 음성 결과의 경우, 경우에 따라 확인시험이 요구될 수 있다.

2. 결과의 해석

양성 결과를 결정하기 위한 다양한 판단기준들이 있다. 즉, 시험농도를 높여 보거나, 최소 한 종의 박테리아를 사용하여 대사활성 유/무 상태에서의 시험 반복횟수를 늘려보는 것이다. 시험결과가 생물학적 상관성이 있는 지를 가장 먼저 살펴보아야 한다. 통계결과만으로 양성 반응여부를 결정하지 않아야 한다.

3. 시험결과의 보고

시험보고서는 다음의 항목을 포함한다.

3.1 시험기관의 명칭 및 소재지

3.2 시험책임자 및 담당자 성명

3.3. 시험물질

- (1) 식별정보 및 CAS 번호
- (2) 물리적 성질과 순도
- (3) 물리화학적 성상
- (4) 시험물질의 안정성

3.4. 용매/보조제

- (1) 용매/보조제 선정의 근거 및 정당성
- (2) 용매/보조제에서 시험물질의 용해성 및 안정성 (자료가 있는 경우)

3.5. 균주

- (1) 사용한 균주
- (2) 배양 당 세포 수
- (3) 균주의 특징

3.6. 시험 조건

- (1) 평판당 시험물질의 양 (mg/plate 또는 $\mu\text{g}/\text{plate}$), 농도 선택, 농도 당 평판수에 대한 논리적 근거
- (2) 사용한 배지
- (3) 판정기준, 대사 활성계의 유형과 조성
- (4) 실험 절차

3.7. 시험 결과

- (1) 독성의 관찰 또는 측정방법
- (2) 침전의 징후
- (3) 각 평판의 계수결과
- (4) 복귀 돌연변이 콜로니의 수와 평균값 및 표준편차
- (5) 농도-반응 관계
- (6) 통계학적 분석
- (7) 본 시험결과에서의 음성대조군과 양성대조군의 결과 (범위, 평균값, 표준

편차 제시)

(8) 과거의 시험결과에서의 음성대조군과 양성대조군 결과 (범위, 평균값, 표준편차 제시)

3.8. 결과에 대한 고찰

3.9. 결론

주) 복귀돌연변이시험의 양성대조물질

구분	화학물질	CAS 번호
+S9	9,10-Dimethylanthracene	781-43-1
	7,12-Dimethylbenzanthracene	57-97-6
	Congo Red - 환원성 대사활성법	573-58-0
	Benzo(a)pyrene	50-32-8
	Cyclophosphamide (monohydrate)	50-18-0 (6055-19-2)
	2-Aminoanthracene	613-13-8
-S9	TA1535 및 TA100: Sodium azide	26628-22-8
	TA98: 2-Nitrofluorene	607-57-8
	TA1537, TA97 및 TA97a: 9-Aminoacridine 또는 ICR191	90-45-9/17070-45-0
	TA102: Cumene hydroperoxide	80-15-9
	WP2 uvrA 및 TA102: Mitomycin C	50-07-7
	WP2, WP2 uvrA 및 WP2 uvrA (pKM101): N-Ethyl-N '-nitro-N- nitrosoguanidine 또는 4-nitroquinoline 1-oxide	70-25-7] 56-57-5]
	플라스미드를 포함하고 있는 균주: Furylfuramide (AF-2)	3688-53-7

제24항 유전독성시험 (포유류 배양세포를 이용하는 염색체이상시험)

I. 개요

1. 목적

본 시험은 배양된 포유류세포 내 염색체의 구조적 이상을 유발시키는 물질을 확인하는데 그 목적이 있다.

2. 용어 정의

2.1 염색체 구조적이상

세포분열 중기에 현미경으로 관찰되는 염색체의 구조적 변화(결실, 절편, 교환 등)

2.2 S9

간 균질액을 9,000 g에서 원심분리하였을 때 생성되는 상층액

2.3 대사활성계 (S9 mix)

S9과 대사 효소 활성화에 필요한 보조인자들의 혼합물

2.4 내재복제 (Endoreduplication)

DNA 복제의 S 단계가 끝난 후에, 핵이 유사분열을 하지 않고 또 다른 S 단계를 시작하여 4 개, 8 개, 16 개...개의 염색 분체를 가진 염색체가 만들어지는 현상

2.5 배수성 (Polyploidy)

염색체 세트중 낱개 염색체의 수치 변화와는 반대로, 모든 염색체 세트 수의 변화를 수반하는 수치적 염색체 이상

2.6 염색 분체형 이상 (Chromatid-type aberration)

단일 염색 분체의 파손이나 염색 분체간의 파손 및 재결합으로 표현된 구조적 염색체 손상

2.7 염색체형 이상 (Chromosome-type aberration)

동일한 부위에서 양 염색 분체의 파손 또는 파손 및 재결합으로 표현되는 구조적 염색체 손상

2.8 염색분체절단

하나의 염색분체에서 명백히 정렬이 어긋나며 분리된 것

2.9 염색분체 겹

하나의 염색분체에서, 정렬이 아주 조금 어긋난 부분에서 나타나는 비염색 부위

2.10 상대 세포수 증가(RICC, Relative increase in cell counts)

대조군 세포수 증가대비 화학물질 처리군 세포수 증가의 백분율

$$RICC(\%) = \frac{(\text{처리된 배양에서의 세포수 증가(최종-시작)})}{(\text{대조군 배양에서의 세포수 증가(최종-시작)})} \times 100$$

2.11 상대 모집단 배가(RPD, Relative population doubling)

화학물질 처리군에서의 세포 수의 배가수를 대조군 배가수의 백분율로 나타낸 것

$$RPD(\%) = \frac{(\text{처리된 배양에서의 집단 배가수})}{(\text{대조군 배양에서의 집단 배가수})} \times 100$$

2.12 유사분열지수(MI, Mitotic index)

세포 집단에서 관찰되는 모든 세포 수에 대한 유사분열 중기에 있는 세포 수의 비율

$$MI(\%) = \frac{(\text{유사분열 세포의 수})}{(\text{획득된 세포의 총수})} \times 100$$

II. 시험

1. 원리

포유류 배양세포를 시험물질에 노출시킨 다음 콜히친이나 콜세미드로 처리하여 세포분열의 중기상태로 만들어 현미경을 통해 염색체 이상을 관찰한다. 배양세포는 대사활성계의 유·무 조건하에서 시험물질에 노출시킨다.

2. 시험의 준비

2.1 세포

다양한 세포주[Chinese hamster ovary (CHO), Chinese hamster lung (CHL)], 사람 또는 포유동물의 말초 혈액 림프구 등을 사용한다. 사람의 말초 혈액 림프구는 최근에 염색체이상의 기초 발생률을 증가시킬 정도의 유전독성 물질에 노출된 적이 없는 젊고 건강한 (대략 18 세 ~ 35 세) 비흡연자로부터 얻는다. 배양세포들은 시험물질을 세포 주기의 각각 다른 단계에 모두 노출시켜야 하며 이를 위해 세포주는 세포를 지수함수적 세포 성장 단계를 유지하도록 하고 말초혈액 림프구는 분열을 유도해야 한다.

2.2 시험물질의 조제

고형 시험물질은 적절한 용매나 보조제를 이용하여 용해 또는 분산시켜 사용하며, 액체 시험물질은 직접 또는 희석하여 사용한다. 기체 혹은 휘발성 시험물질은 밀봉 배양용기를 사용하는 등 적절한 방법을 사용하여 시험한다. 조제물의 안정성자료가 확보되지 않을 경우 시험 직전에 조제한다.

2.3 용매 또는 보조제

시험물질을 용해 또는 분산시키기 위해 사용되는 용매/보조제는 시험물질

과 화학적 반응을 하지 않는 것이라야 하며, 세포의 생존과 S9 활성화에 적합해야 한다. 용매로서 우선 고려할 수 있는 것은 배양배지이다. 수용성 용매(식염수 혹은 물)는 배지 중에서의 최종 농도가 10 %(v/v)를 넘지 않아야 하며 디메틸설폭사이드 등 유기용매는 1 %(v/v)를 넘지 않아야 한다. 잘 알려진 용매/보조제 이외의 것을 사용하는 경우는, 이들 사용의 적합성을 증명할 수 있는 자료를 첨부하여야 한다.

2.4 배양조건

세포배양이 지속되는 동안 적절한 배양 배지와 배양 조건(배양용기, 5 % CO₂ 및 37 °C)이 유지되어야 한다. 세포주는 본래의 염색체수가 유지되는지 염색체의 안정성을 정기적으로 확인하여야 하며 마이코플라스마(Mycoplasma) 오염이 일어나지 않아야 한다. 만약 세포가 오염되었거나 염색체수가 변했다면 시험에 사용할 수 없다.

2.5 배양준비

(1) 세포주

원보존세포로부터 일정 농도의 세포를 취하여 배양배지에 넣고 배양시키며, 이때 취하는 세포의 양은 표본을 제작할 시간까지 지수함수적으로 계속 성장할 수 있을 정도의 적절한 양을 취하여야 한다. 배양용기에서 단층을 형성할 때 까지 성장한 세포들을 시험에 사용하는 것은 피해야 한다.

(2) 림프구

헤파린 등 항응고제를 처리한 전혈이나 분리된 림프구는 시험물질에 노출시키기 전, 피토헤마글루티닌(PHA, Phytohaemagglutinin) 등 유사분열촉진제로 세포분열을 유도한다.

2.6 대사활성계(S9 mix)

사용되는 세포의 본래의 대사능력이 적절하지 않을 경우 외인성 대사활성계를 사용한다. 간 효소의 유도제인 아로클로 1254(Aroclor 1254) 또는 페노바

비탈(Phenobarbital) 및 β -나프토플라본(β -naphthoflavone)의 혼합물을 투여하여 간에서 S9을 조제하고 사용시에는 보조효소 등을 첨가하여 S9 mix를 준비한다. S9 mix는 최종 시험배지에서 1 % ~ 2 %(v/v) 농도 범위로 사용되지만 10 %(v/v)까지 증가시킬 수 있다.

2. 시험방법

2.1 시험물질 농도

시험물질의 농도는 3 단계 이상의 분석 가능한 농도를 설정한다. 세포독성이 있는 물질인 경우, 최고 농도는 세포증식 또는 세포분열을 50 % 이상 억제하는 농도로 설정하고 2와 $\sqrt{10}$ 사이의 공비로 하여 단계적으로 농도를 설정하여 시험한다. 세포주의 경우 세포독성 지표(RICC, RPD를 사용하여 55 % \pm 5 %의 세포독성을 나타내는 농도를 최고 농도로 하며 림프구의 경우 MI가 45 % \pm 5 %로 감소하는 농도를 최고 농도로 설정한다. 55 % \pm 5 %의 세포독성을 보이는 최고 농도에서만 양성반응이 나타난다면 결과판정에 주의를 요한다. 세포독성이 비교적 약한 물질인 경우는 2 μ L/mL, 2 mg/mL 또는 10 mM의 농도를 최고 농도로 한다. 비교적 난용성인 물질의 경우, 녹지 않는 농도 이하에서 독성이 없다면 혼탁 또는 침전물이 형성되는 최저농도를 최고 농도로 한다. 이 경우 침전물은 육안으로 관찰할 수 있어야 하며 계수를 방해할 정도여서는 안 된다. 시험물질의 성분이 알려지지 않은 혼합물, 생물학적 추출물, 환경 추출물 등의 경우에는 혼합물의 농도를 높일 필요가 있다 (예를 들면 5 mg/mL).

2.2 대조군

매 시험마다 대사활성계의 유·무 조건하에서 적절한 양성(용매 또는 보조제) 대조군을 포함하여야 한다. 실험실에서는 양성 대조물질을 시험 프로토콜에 따라 시험하였을 경우 염색체이상을 유발하며 아울러 외인성대사활성계는 그 유효성을 나타내고 있다는 것을 보여주어야 한다. 양성대조군은 알려진 염색체이상 유발물질을 사용하여야 한다(표).

<표> 포유류 배양세포를 이용하는 염색체이상시험의 양성대조물질

구분	화학물질	CAS 번호
-S9	Methyl methanesulphonate	66-27-3
	Mitomycin C	50-07-7
	4-Nitroquinoline-N-Oxide	56-57-5
	Cytosine arabinoside	147-94-4
+S9	Benzo(a)pyrene	50-32-8
	Cyclophosphamide	50-18-0

2.3 시험물질의 처리 및 표본의 제작

1 차 시험(대사활성법)을 수행할 때에는 대사활성계의 유·무 모두에 대하여 시험물질을 세포에 적어도 3 시간 ~ 6 시간 노출시키고, 시험물질 처리 후 세포의 약 1.5 증식주기 해당시기에 염색체 표본을 제작한다. 1 차 시험에서 대사활성계의 유·무 모두에서 음성인 결과가 얻어지면, 대사활성계부재하[직접법]에서 세포에 시험물질을 세포의 약 1.5 증식주기 해당시기까지 연속처리한 후 (세포 1.5 증식주기이상 시험물질적용) 염색체 표본을 제작한다.

음성/용매 대조군을 포함하여 각 농도 당 적어도 2 배 이상의 배양 플레이트를 처리한다. 염색체 표본 제작에 앞서 1 시간 ~ 3 시간 전에 배양 세포에 콜세미드 (혹은 콜히친) 처리를 한 후 염색체 표본을 제작한다. 유사분열 세포들은 배양용기로부터 쉽게 분리되기 때문에, 염색체 이상이 나타날 가능성이 있는 세포가 처리 종료시에 유사분열중인 경우 표본제작에서 배제될 수 있으므로 주의를 요한다.

2.4 염색체 이상의 관찰

용량 당 300 개의 분열 중기 상에 대하여 염색체의 구조적이상(염색체형이상, 염색분체형 이상으로 구분)을 가진 세포의 출현율을 구하며, 각 유형별 구조적 이상(절단, 교환)의 수와 출현빈도를 기록한다. 염색체의 수적이상이 관찰되는 경우 별도로 기록한다. 염색체이상의 분석은 숙련된 연구원에 의

해서 수행되어야 하며 이 사실이 기술되어야 한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리 및 평가

1.1 결과의 처리

염색체이상시험은 염색체이상이 발현된 세포의 백분율로 표시하여야 한다. 대조군 및 처리군 모두에 대하여, 염색분체형 이상 및 염색체형 이상을 모두 하위 유형(절단, 교환)으로 분류하여 그 수와 출현빈도를 각각 표시하여야 한다. 겹은 별도로 기록하고, 염색체 이상의 총빈도수에는 포함시키지 않는다. 배수성 또는 내재복제가 나타날 경우 백분율로 표시한다.

1.2 승인기준

시험이 적절하게 수행되었는지에 대한 판단은 다음 기준에 따른다.

- (1) 본 시험에서 수행한 음성 대조군의 결과가 해당 실험실에서 수행하여 왔던 기존의 음성 대조군의 결과와 유사한 범위로 간주된다.
- (2) 본 시험에서 수행한 양성 대조군의 결과가 해당 실험실에서 수행하여 왔던 기존의 양성 대조군의 결과와 유사한 범위에 속하며 아울러 음성 대조군에 비해 통계학적으로 유의하게 증가하여야 한다.
- (3) 용매 대조군 내의 세포증식 기준이 충족되어야 한다.
- (4) 세 가지 실험 조건들 (+S9 또는 -S9 상태에서 3 시간 ~ 6 시간 노출, -S9 상태에서 1.5 증식주기 후 표본제작시 까지 노출)중 하나라도 양성을 나타내지 않는 한, 세 조건을 모두 시험하였다.
- (5) 적절한 세포수와 농도가 분석가능하다.
- (6) 최고농도를 선정하기 위한 기준이 적합하다.

1.3 결과의 평가와 해석

- (1) 시험물질이 다음에 제시하는 승인기준을 모두 충족한다면 그 시험물질은 양성인 것으로 간주한다.

- ① 시험농도들 중 최소 하나 이상의 농도에서 본 시험과 동시에 수행된 음성 대조군의 결과에 비해 염색체 이상이 통계학적으로 유의하게 증가하였다.
 - ② 증가되는 패턴이 적절한 농도의존적으로 나타났다.
 - ③ 결과 중 하나라도 해당 실험실에서 그간 수행해온 기존의 음성 대조군의 결과를 벗어나는 분포를 나타내었다.
- (2) 시험물질이 다음의 모든 기준을 충족한다면 시험물질은 음성인 것으로 간주한다.
- ① 시험 농도 중 어느 것도 해당 실험실에서 그간 수행해온 기존 음성 대조군의 결과와 비교하였을 때 통계학적으로 유의하게 염색체이상을 증가시키지 않았다.
 - ② 적절한 경향성 시험으로 평가하였을 때 농도의존적인 증가가 없다.
 - ③ 모든 결과들은 해당 실험실에서 그간 수행해온 기존의 음성 대조군의 결과의 분포 범위내에 있다.

2. 시험결과의 보고

시험보고서는 다음의 항목을 포함한다.

2.1 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명

2.3 시험물질 정보

- (1) 식별정보 및 CAS 번호
- (2) 물리적 성질과 순도
- (3) 이화학적 성질
- (4) 시험물질의 안정성
- (5) 시험물질의 용매 내에서의 용해도와 안정성
- (6) 시험물질이 가해진 배양배지 내에서의 pH, 삼투압, 침전의 측정

2.4 용매/보조제 종류 및 선정근거

2.5 사용한 세포에 대한 정보

- (1) 세포의 유형과 출처

- (2) 핵형 특성과 사용되는 세포 유형의 적합성
- (3) 세포주 내 마이코플라즈마 오염여부
- (4) 세포주기, 배가시간(Doubling time) 또는 세포증식 지수
- (5) 혈액 기증자의 성별, 나이, 기타 관련정보
- (6) 전혈(Whole blood) 혹은 분리림프구
- (7) 사용된 유사분열 유발물질
- (8) 세포주의 계대수
- (9) 배양세포의 유지 방법
- (10) 세포주 원래의 염색체수

2.6 시험조건

- (1) 분열중기 정지 물질의 식별정보, 농도, 처리기간
- (2) 시험물질의 처리 농도
- (3) 농도 선정 및 반복수 선정의 근거
- (4) 배지조성, CO₂ 농도, 습도
- (5) 용매 및 시험물질의 양
- (6) 배양온도 및 배양 시간
- (7) 시험물질 적용기간 및 처리 후 표본제작 시간
- (8) 접종 시 세포 밀도
- (9) 대사활성계의 종류 및 구성
- (10) 양성 및 음성 대조물질
- (11) 시험의 승인기준
- (12) 염색체이상 계수 기준
- (13) 분석된 분열 중기상 세포의 수
- (14) 세포독성 관찰방법
- (15) 양성, 음성, 의양성 판정기준
- (16) pH, 삼투압, 침전을 측정하는 데 사용된 방법

2.7 시험결과

- (1) 처리된 세포의 수, 각 배양으로부터 얻은 세포의 수 (세포주의 경우)
- (2) 세포독성 지표(RPD, RICC, MI 등)
- (3) 침전의 징후와 형성 시간
- (4) 각 처리군 및 대조군의 염색체 이상을 갖는 세포수와 염색체 이상의 종류
- (5) 염색체 수의 변화 (배수성 등)
- (6) 농도-반응관계
- (7) 음성 및 양성 대조군 결과
- (8) 기존에 축적된 음성 및 양성 대조군 결과의 범위, 평균, 표준편차 등
- (9) 통계분석법

2.8 시험결과에 대한 고찰 및 결론

제25항 유전독성시험 (포유류 골수세포를 이용하는 소핵시험)

I. 개요

1. 목적

이 시험은 설치류와 같은 동물에서 골수 및 말초혈액의 미성숙 적혈구 분석을 통해 시험물질의 생체 내 노출에 의해 유발되는 염색체 또는 유사분열기관 손상을 확인하는데 목적이 있다.

2. 용어 정의

2.1 소핵(micronuclei)

세포분열의 말기상태에서 핵으로부터 분리된 염색체의 조각들 또는 온전한 염색체로 구성된 작은 입자들

2.2 다염성(미성숙) 적혈구 (Polychromatic or immature erythrocyte)

혈구 모세포의 발생 중간 단계에서 형성된 적혈구. 세포 안에 잔류 RNA가 존재하기 때문에 Wright's Giemsa와 같은 염색제의 청색 혹은 적색 성분에 의해 염색되어 성숙 적혈구와 구별됨

2.3 정염성(성숙) 적혈구 (Normochromatic or mature erythrocyte)

완전히 성숙한 적혈구로서 탈핵 후에 남은 잔류 RNA가 없고, 최종 적아세포(Erythroblast) 분열 이후의 탈핵 후 사라지는 것이 특징인 일시적 세포 지표(Sort-lived cell markers)가 없는 적혈구

2.4 적아세포 (Erythroblast)

미성숙 적혈구의 바로 전 단계로, 아직 세포가 핵을 포함하고 있는 적혈구 발달의 초기 단계 세포

II. 시험

1. 원리

동물을 시험물질에 노출시킨 후 적절한 시기에 골수 혹은 말초혈액 표본을 분석하여 소핵을 함유한 미성숙 적혈구가 유도되는지 관찰함으로써 시험물질이 세포유전학적 손상을 일으키는지 확인한다. 표본의 소핵은 현미경 계수, 이미지 분석(Image analysis), 유세포분석(Flow cytometry), 레이저 주사 혈구계산(Laser scanning cytometry) 등에 의해 분석된다.

2. 시험의 준비

2.1 시험동물

랫드 또는 마우스의 사용을 권장한다. 시험 개시 시 시험동물의 체중 차이는 각 성의 평균 체중의 20 %가 넘지 않도록 한다. 동물 수는 시험군 당 최소 5 마리 이상을 사용하고 시험 전 최소한 5 일 이상의 순화기간을 둔다. 암·수 사이에 독성에 대한 감수성 차가 없다고 판단되는 경우 한 가지 성으로 시험하며 일반적으로 수컷을 이용한다. 단, 노출대상이 성 특이성을 야기할 수 있는 물질은 암·수 가운데 적절한 성을 선택하여 사용한다. 각 동물의 식별을 용이하게 하기 위해 개개의 동물에 표시를 한다.

2.2 사육조건

사육실은 온도가 $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, 습도가 40 % ~ 70 %가 유지되도록 한다. 사육은 개별적으로 또는 같은 성별의 소그룹 단위로 나누어 실시한다. 인공 조명으로 매 12 시간 간격으로 점멸한다. 사료는 일반적으로 널리 쓰는 것을 사용하며, 음용수는 무제한적으로 공급한다.

2.3 시험물질의 조제

고형 물질은 적절한 용매나 보조제를 사용하여 용해 또는 분산시켜 사용한다. 액체물질은 직접 사용하거나 또는 적절히 희석하여 사용한다. 조제된 시험물질의 안정성 자료가 확보되지 않은 경우, 시험 직전에 조제한다.

2.4 용매 또는 보조제의 사용

용매 또는 보조제는 투여한 농도에서 독성이 없고 동시에 시험물질과 화학적 반응을 하지 않는 것이라야 한다. 우선적으로 수용성인 용제 또는 보조제의 사용을 고려하도록 한다. 잘 알려진 용매 또는 보조제 이외의 것을 사용할 경우, 이들 사용의 적절성을 증명할 수 있는 자료를 제시하도록 한다.

3. 시험방법

3.1 용량

시험물질에 대한 독성 정보가 부족할 경우, 시험농도를 선정하기 위한 용량 결정시험을 수행할 수 있다. 독성증상이 나타나는 용량을 최고 용량으로 하며, 적어도 3 단계의 용량을 설정한다. 만약 시험물질이 용량결정시험에서 혹은 기존 자료에 근거했을 때 독성을 나타내지 않을 경우, 최고 용량은 투여기간이 14 일 이상이면 1,000 mg/kg/day, 투여기간이 14 일 미만이면 2,000 mg/kg/day로 한다. 시험물질이 독성을 일으킨다면, 투여되는 최고용량은 최대내성용량 (MTD; maximum tolerated dose)로 하며 용량 수준은 최대용량에서부터 독성을 약간 일으키거나 일으키지 않는 용량까지의 범위를 포함하도록 한다.

3.2 한계시험

2,000 mg/kg/day 용량에서 독성이 나타나지 않고, 구조상 유사한 물질의 유전독성 시험결과를 토대로 하여 유전독성이 없다고 예상된다면 3 개 농도군을 설정할 필요가 없으며, 한계용량만으로 시험을 실시할 수 있다. 투여기간이 14 일 미만이면 2,000 mg/kg/day를 한계용량으로 하고, 투여기간이 14 일 이상이면 한계용량을 1,000 mg/kg/day로 한계시험을 수행한다.

3.3 대조군

매 시험마다 동시에 수행되는 양성(용매 또는 보조제) 대조군을 포

합하도록 한다. 양성대조군은 알려진 소핵 유발물질을 사용하여야 한다. 양성대조군 물질의 예는 표에 나타나 있다.

시험군에서 시험물질을 투여하는 데 용매/보조제를 사용한다면 음성대조군에 동일한 용매/보조제를 투여한다.

<표> 포유류 적혈구를 이용하는 소핵시험의 양성대조물질

화학물질	CAS 번호
Ethyl methanesulphonate	62-50-0
Methyl methanesulphonate	66-27-3
Ethyl nitrosourea	759-73-9
Mitomycin C	50-07-7
Cyclophosphamide(monohydrate)	50-18-0 (6055-19-2)
Triethylenemelamine	51-18-3
Colchicine Vinblastine - 이수성유발물질	64-86-8 865-21-4

3.4 시험물질의 투여

시험물질은 위관 투여법을 이용한 경구 투여가 일반적이지만 필요에 따라 다른 투여경로도 허용된다. 시험물질 투여는 시험물질이 인체에 노출되는 예상 경로를 고려하여 결정한다. 투여용량은 동물의 체중 100 g 당 1 mL를 넘지 않아야 하지만, 수용액의 경우 최대 2 mL/100 g이 사용될 수 있다. 1회 투여를 원칙으로 하지만, 필요에 따라 연속투여를 실시할 수도 있다. 시험물질 투여 후 각 군의 전 동물로부터, 골수세포 혹은 말초혈액의 적혈구 표본을 제작한다.

3.5 투여일정 및 표본 채취

투여 및 표본 채취는 마우스나 랫드에서 다음 세 가지 방법 중의 하나로 수행된다.

- (1) 단회 투여의 경우 골수 표본은 각각의 동물군으로부터 적어도 2 회 채취하는데, 시험물질이 예외적으로 긴 반감기를 가진다는 것이 알려져 있지 않는 한, 처리 후 24 시간 ~ 48 시간 사이에 적당한 간격으로 표본을 채취한다. 말초 혈액 표본은 같은 동물 그룹에서 적어도 2 회 채취하는데, 처리 후 36 시간 ~ 72 시간 사이에 적당한 간격으로 표본을 채취한다. 첫 표본 채취 시에는 모든 투여량 그룹의 표본을 채취하고, 이후의 표본 채취는 최고 용량 군만 수행한다.
- (2) 이틀간 투여하는 경우(예를 들어 24 시간 간격 2 번 처리), 표본채취는 골수의 경우 마지막 처리 이후 18 시간 ~ 24 시간 사이에 한 번, 말초 혈액의 경우, 마지막 처리 이후 36 시간 ~ 48 시간 사이에 한 번 채취한다.
- (3) 만약 3 일 이상 매일 시험물질을 투여한다면 (예를 들어 대략 24 시간 간격으로 3 번 이상 처리), 골수 표본은 마지막 처리 이후 24 시간 이내에 채취하고, 말초 혈액 표본은 마지막 처리 후 40 시간 이내에 채취한다. 이와 같은 투여일정 및 표본 채취 방법은 유전자 해성 분석법 (Comet assay)과 소핵시험을 동시에 수행하거나 소핵시험과 반복투여독성 시험을 병합하여 수행할 때 적용할 수 있다.

3.6 관찰사항

시험 동물의 일반적인 임상적 관찰이 하루 1 회 이상, 투여 이후에 예상되는 효과의 최고 시점을 고려하여 기록되어야 한다. 투여 기간 동안 최소 하루에 2 회 이환율과 사망률을 조사한다. 모든 시험동물에서 시험 개시 시, 반복투여 시험 기간 동안 최소 1 주 1 회, 그리고 안락사 시에 체중을 측정한다. 1 주 이상의 연구에서는 매주 사료 소비량을 측정한다. 시험물질이 음용수를 통하여 투여되는 경우 음용수의 교체시마다 소비량을 측정한다. 경우에 따라 동물의 체온을 기록한다.

3.7 표적 장기 노출

필요시 골수가 시험물질에 노출되었는지 판단하기 위하여 시험물질 혈중농

도 측정을 위한 혈액 표본을 채취한다.

3.8 골수 및 혈액 준비

골수 세포는 안락사 시킨 직후에 동물의 대퇴골 혹은 경골에서 취한다. 말초혈액은 시험동물을 계속 생존시킬 필요가 있을 경우에는 꼬리 혈관 등으로부터 채취한다. 안락사 시킬 경우에는 심장천자나 큰 혈관으로부터 소량의 혈액을 채취한다. 골수나 말초혈액에서 추출된 적혈구 세포들은 분석 방법에 따라 즉시 염색하거나, 현미경 관찰을 위해 도말 및 염색하거나, 또는 유세포분석을 위해 고정 및 염색한다.

3.9 분석

표본은 맹검(blind test)에 적합하도록 번호를 부여하고 수동 혹은 자동 분석을 실시한다. 전체 적혈구(미성숙 + 성숙) 중의 미성숙 적혈구의 비율을 구하기 위해 각 동물마다 골수에서는 최소 500 개의 적혈구, 말초 혈액에서는 최소 2,000 개의 적혈구를 계수한다. 소핵을 가진 미성숙 적혈구의 출현빈도를 구하기 위해서는 동물 당 적어도 4,000 개의 미성숙 적혈구를 계수한다. 시험군에서 총 적혈구 수에 대한 미성숙 적혈구의 비율은 보조제/용매 대조군 값의 20 % 보다 작아서는 안 되고, 유세포분석 방법에 의해 얻은 CD71+ 미성숙 적혈구를 기록할 때에는 시험군에서의 비율이 용매/보조제 대조군 값의 5 % 이상이어야 한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리 및 평가

각 동물 당 계수한 미성숙 적혈구(다염성적혈구) 수와 소핵을 가지는 미성숙 적혈구의 수, 전체 적혈구 중 미성숙 적혈구 비율을 기록한다. 소핵을 가진 적혈구 수가 용량 의존적으로 증가하거나 또는 1 개 이상의 용량 단계에서 확실하게 증가할 경우 양성으로 판정한다. 판정에 있어서 생물학적 유의성이 일차적으로 고려되어야 하며, 통계적 유의성만으로 양성반응을 결정해

서는 안 된다. 골수가 시험물질에 노출되었으나 소핵시험결과가 양성판정기준에 해당되지 않을 때는 음성으로 간주한다.

2. 승인기준

다음 승인기준으로 시험이 적절히 수행되었는지 판단한다.

- (1) 동시 수행된 음성 대조군 자료가 기존 대조군 자료에 부합
- (2) 동시 수행된 양성 대조군 자료가 기존 대조군 자료에 부합하고, 음성 대조군과 확실한 통계적 차이를 나타냄
- (3) 투여군 및 결과 분석용 세포 수가 적절함
- (4) 용량 설정 기준에 따라 최고 투여용량이 설정됨

3. 시험결과의 보고

시험보고서는 다음의 항목을 포함한다.

3.1 시험기관의 명칭 및 소재지

3.2 시험책임자 및 담당자 성명

3.3 시험물질 정보

- (1) 식별 데이터 및 CAS 번호
- (2) 물리적 특성과 순도
- (3) 이화학적 성상
- (4) 시험 물질의 안정성

3.4 용매/보조제 정보

- (1) 종류 및 선정근거
- (2) 시험물질의 용해도 및 안정성

3.5 시험동물에 관한 정보

- (1) 동물의 종/계통
- (2) 동물의 수, 주령, 성별
- (3) 구입처, 사육조건, 사료
- (4) 동물 식별 방법

- (5) 동물의 체중범위, 각 그룹별 평균 및 표준 편차를 포함하여 시험을 시작 및 종료할 때 동물의 개별 중량, 1 주 이상 연구의 경우 연구 중 개별 동물의 체중

3.6 시험조건

- (1) 음성 (용매/보조제) 및 양성대조군 설정 조건
- (2) 용량설정시험 조건
- (3) 투여용량 선정 근거
- (4) 투여경로 선정 근거 및 투여방법, 투여일정
- (5) 사료 및 음용수 성적서
- (6) 골수 혹은 말초혈액 채취 시기
- (7) 독성의 관찰 또는 측정방법, 동물 당 관찰 세포 수
- (8) 표본 제작방법
- (9) 동물 당 관찰 세포 수
- (10) 양성(또는 의양성) 및 음성 판단 기준
- (11) 시험물질이 표적 장기에 도달했다는 것을 증명하기 위한 방법
- (12) 안락사 방법 및 진통 방법, 안락사 시점
- (13) 표본 추출 및 보존 절차
- (14) 시험의 승인 기준
- (15) 소핵이 전체 염색체를 가지는지 조각난 염색체를 가지는지 특징짓기 위한 항 동원체 항체(Anti-kinetochore antibodies) 혹은 중심립 특이적 DNA 표지(Centromere-specific DNA probes)의 사용과 같은 방법

3.7 시험결과

- (1) 독성 증상
- (2) 적혈구 중 다염성 적혈구 비율
- (3) 소핵이 관찰된 다염성 적혈구 수
- (4) 각 시험군에서 소핵이 관찰된 다염성 적혈구수의 평균과 표준편차
- (5) 다염성 적혈구의 전체 적혈구 비율
- (6) 통계분석법

- (7) 음성 및 양성대조군 결과
 - (8) 과거 축적된 음성대조물질 및 양성대조물질 결과
 - (9) 용량반응관계
 - (10) 골수 노출 자료
 - (11) 소핵이 전체 염색체를 가지는지 조각난 염색체를 가지는지를 나타내는
특징부여자료
 - (12) 양성 혹은 음성반응 충족 기준
- 3.8 시험결과에 대한 고찰 및 결론

제26항 유전독성시험 (포유류 정원세포를 이용하는 염색체이상시험)

I. 개요

1. 목적

이 시험은 포유류의 정원세포 내 구조적 이상을 유발하는 물질을 확인하는데 목적이 있다. 구조적 이상은 두 가지 유형, 즉 염색체형 이상 또는 염색분체형 이상 중 하나일 수 있다. 이 시험은 염색체 숫자의 변화를 측정할 목적으로는 사용되지 않는다.

2. 용어정의

2.1 염색체 구조적 이상

세포분열 중기에 현미경으로 관찰되는 염색체의 구조적 변화 (결실, 절편, 교환 등)

2.2 염색체형 이상 (Chromosome-type aberration)

동일한 부위에서 양 염색 분체의 파손 또는 파손 및 재결합으로 표현되는 구조적 염색체 손상

2.3 염색 분체형 이상 (Chromatid-type aberration)

단일 염색 분체의 파손이나 염색 분체간의 파손 및 재결합으로 표현된 구조적 염색체 손상

2.4 갭 (Gap)

1 개 염색 분체의 폭보다 더 작고, 염색 분체의 정렬 불량이 최소인 비염색 손상부위

II. 시험

1. 원리

동물을 시험물질에 노출시킨 후, 콜히친이나 콜세미드로 처리하여 세포분열 중기상태로 만든다. 생식 세포인 정원세포 표본 중 중기 세포를 분석하여 염색체 이상을 관찰한다.

2. 시험의 준비

2.1 시험동물

수컷 중국 햄스터 및 마우스의 사용을 권장한다. 시험 개시 시 시험동물의 중량 변동이 최소한이어야 하며 평균 체중의 20 %가 넘지 않도록 한다. 동물 수는 시험군 당 최소 5 마리 이상을 사용하며 시험 전 최소한 5 일 이상의 순화기간을 둔다. 각 동물의 식별을 용이하게 하기 위해 개개의 동물에 표시를 한다.

2.2 사육조건

사육실은 온도가 $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, 습도가 40 % ~ 70 %가 유지되도록 한다. 사육은 개별적으로 또는 같은 성별의 소그룹 단위로 나누어 실시한다. 인공 조명으로 매 12 시간 간격으로 점멸한다. 사료는 일반적으로 널리 쓰는 것을 사용하며, 음용수는 무제한적으로 공급한다.

2.3 시험물질의 조제

고형 물질은 적절한 용매나 보조제를 이용하여 용해 또는 분산시켜 사용하며, 액체물질은 직접 또는 희석하여 사용한다. 조제물의 안정성자료가 확보되지 않을 경우 시험 직전에 조제한다.

2.4 용매 또는 보조제의 사용

용매 또는 보조제는 투여한 농도에서 독성 영향이 없어야 하며, 동시에 시험물질과 화학적 반응을 하지 않는 것이라야 한다. 우선적으로 수용성인 용

제 또는 보조제의 사용을 고려하도록 한다. 잘 알려진 용매/보조제 이외의 것을 사용하는 경우, 이들 사용의 적절성을 증명할 수 있는 자료를 제시하여야 한다.

3. 시험방법

3.1 용량

시험물질에 대한 독성 정보가 부족할 경우, 시험농도를 선정하기 위한 용량 결정시험을 수행할 수 있다. 시험물질의 용량단계는 첫 번째 표본 추출 시간에 대해서 3 단계의 농도를 설정한다. 이 투여량 수준은 최대 독성부터 무독성을 나타내는 용량범위를 포함하여야 한다. 후기 표본 추출 시간에는 최고 투여량만 이용한다. 최고 투여량은 동일 투여 방법으로 한 단계 더 높은 용량을 투여한다면 동물을 치사시키리라 예상되는 투여량으로 한다. 정 원세포에 어떤 독성을 나타내는 용량을 최고용량으로 할 수도 있다.

3.2 한계시험

2,000 mg/kg/day 용량에서 독성이 나타나지 않고, 구조상 유사한 물질의 유전독성 시험결과를 토대로 하여 유전독성이 없다고 예상된다면 3 단계 용량군을 설정할 필요가 없다. 예상되는 인체노출량에 따라 좀 더 높은 투여량 수준으로 한계시험을 실시할 수 있다.

3.3 대조군

매 시험마다 동시에 수행되는 양성(용매 또는 보조제) 대조군을 포함하여야 한다. 양성대조군은 알려진 염색체이상 유발물질을 사용하여야 하며 목록은 아래 표와 같다. 시험군에서 시험물질을 투여하는 데 용매/보조제를 사용한다면 음성 대조군에 대해서도 동일한 용매/보조제를 투여한다.

<표>. 포유류 정원세포를 이용하는 염색체 이상 시험의 양성대조물질

화학물질	CAS 번호
Cyclophosphamide (monohydrate)	50-18-0 (6055-19-2)
Cyclohexylamine	108-91-8
Mitomycin C	50-07-7
Monomeric acrylamide	79-06-1
Triethylenemelamine	51-18-3

3.4 시험물질의 처리

시험 물질은 단회 혹은 2 회 투여한다. 대량의 물질 투여를 용이하게 하기 위해 시험 물질을 분할하여 몇 시간 이내로 2 회 투여할 수 있다.

투여 방법은 일반적으로 위장관 튜브 또는 적합한 삼관 캐놀라를 이용한 위관 투여법이나 복강 내 주입을 이용한다. 한 번에 투여될 수 있는 최대량은 동물의 크기에 따라 다르며 체중 100 g 당 2 mL를 초과하지 않도록 한다.

3.5 표본 추출 및 제작

최고 투여량 그룹에서는 시험물질 투여 후 2 회의 표본 추출을 이용한다. 처리 후 대략 24 시간 ~ 48 시간에 두 번의 추출을 시행한다. 이외의 투여량의 경우는 처리 후 24 시간 또는 1.5 세포 주기 길이의 시간에 표본을 추출한다.

마우스의 경우 표본 추출로부터 3 시간 ~ 5 시간 이전, 중국 햄스터의 경우 표본 추출로부터 4 시간 ~ 5 시간 이전에 동물의 복강 내에 콜히친이나 콜세미드를 적정량 주입한다. 안락사 시킨 직후에, 저장성 용액에 고정된 정소로부터 세포 현탁액을 얻고 현탁액을 슬라이드에 도말하고 염색한다.

3.6 염색체 이상의 관찰

동물 당 최소 100 개의 분열 중기 (즉, 그룹 당 최소한 500 개의 중기)에 대

하여 분석한다. 분석에 앞서 모든 슬라이드를 암호화한다. 고정 작업 중 종 종 염색체가 손실되거나 중기의 부분적 파괴가 나타날 수 있으므로, 계수된 세포들은 $2n \pm 2$ 이상의 중심립/동원체(Centromere)를 포함해야 한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리 및 평가

개별 동물 데이터는 도표 형식으로 제시한다. 동물 별로 염색체 구조적 이상 세포의 수 및 세포 당 염색체 이상의 수를 평가한다. 염색체 이상을 가진 세포 수가 투여 용량에 비례하여 증가하거나, 표본제작시기에 상관없이 어느 한 용량에서 염색체 이상을 나타내는 세포수가 유의적으로 증가하면 양성 반응으로 판단한다. 결과를 평가하는데 있어서 적절한 통계처리법을 사용할 수 있으나, 생물학적 유의성이 일차적으로 고려되어야 하며, 통계적 유의성만으로 양성반응을 결정해서는 안 된다.

갭 (gap)의 경우 별도로 기록하며, 염색체 이상의 총 빈도수에는 포함시키지 않는다.

2. 시험결과의 보고

시험보고서는 다음의 항목을 포함한다.

2.1 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명

2.3 시험물질 정보

(1) 식별 데이터 및 CAS 번호

(2) 물리적 특성과 순도

(3) 이화학적 성상

(4) 시험 물질의 안정성

2.4 용매/보조제 정보

(1) 종류 및 선정근거

(2) 시험물질의 용해도 및 안정성

2.5 시험동물에 관한 정보

- (1) 종/계통
- (2) 동물의 수, 나이, 성별
- (3) 구입처, 사육조건, 사료
- (4) 동물 식별 방법
- (5) 동물의 체중범위, 각 그룹별 평균 및 표준 편차를 포함하여, 시험을 시작 및 종료할 때 동물의 개별 중량

2.6 시험조건

- (1) 음성(용매/보조제) 및 양성대조군 설정 조건
- (2) 용량 설정 시험 조건
- (3) 투여용량 선정근거
- (4) 투여 경로 선정 근거 및 투여방법, 투여일정
- (5) 시험 물질 준비 및 투여의 세부사항
- (6) 안락사 시점 선정 근거
- (7) 사료 및 식수 시험 물질 농도(ppm)로부터 실제 투여량(mg/kg 체중/일)으로 환산
- (8) 사료 및 음용수 성적서
- (9) 안락사 및 진통 방법, 안락사 시점
- (10) 표본 추출 및 슬라이드 제작 방법
- (11) 독성의 관찰 또는 측정방법
- (12) 분열중기정지물질의 특성/ 농도/ 표본 채취 전 투여량과 투여시간
- (13) 이상 채점 기준
- (14) 동물 당 분석된 세포의 수
- (15) 양성 및 음성 판정 기준

2.7 결과

- (1) 독성 증상
- (2) 유사 분열 지수
- (3) 정원 유사 분열 세포 대 최초 및 두 번째 감수 분열 중기의 비율

- (4) 각 동물에서 관찰된 이상의 유형과 수
 - (5) 각 시험군에서 이상의 총수 및 이상이 있는 세포의 수
 - (6) 용량반응관계
 - (7) 통계분석법
 - (8) 양성 혹은 음성반응 충족 기준
 - (9) 음성 및 양성대조군 결과
 - (10) 배수성 변화
- 2.8 시험결과에 대한 고찰 및 결론