

**화장품 안자극 동물대체시험법
[단시간 노출법, STE] 가이드라인
(민원인 안내서)**

2017. 9.



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

독성평가연구부 특수독성과

지침서·안내서 제·개정 점검표

명칭

화장품 안자극 동물대체시험법(단시간 노출법, STE) 가이드라인(민원인 안내서)

아래에 해당하는 사항에 체크하여 주시기 바랍니다.

등록대상 여부	☐ 이미 등록된 지침서·안내서 중 동일·유사한 내용의 지침서·안내서가 있습니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☞ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 기존의 지침서·안내서의 개정을 우선적으로 고려하시기 바랍니다. 그럼에도 불구하고 동 지침서·안내서의 제정이 필요한 경우 그 사유를 아래에 기재해 주시기 바랍니다. (사유 :)	
	☐ 법령(법·시행령·시행규칙) 또는 행정규칙(고시·훈령·예규)의 내용을 단순 편집 또는 나열한 것입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 단순한 사실을 대외적으로 알리는 공고의 내용입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 1년 이내 한시적 적용 또는 일회성 지시·명령에 해당하는 내용입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 외국 규정을 번역하거나 설명하는 내용입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 신규 직원 교육을 위해 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 정리한 자료입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
☞ 상기 사항 중 어느 하나라도 '예'에 해당되는 경우에 지침서·안내서 등록 대상이 아닙니다. 지침서·안내서 제·개정 절차를 적용하실 필요는 없습니다.		
지침서·안내서 구분	☐ 내부적으로 행정사무의 통일을 기하기 위하여 반복적으로 행정사무의 세부기준이나 절차를 제시하는 것입니까? (공무원용)	☐ 예(☞지침서) ☒ 아니오
	☐ 대내외적으로 법령 또는 고시·훈령·예규 등을 알기 쉽게 풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전처의 입장을 기술하는 것입니까? (민원인용)	☒ 예(☞안내서) ☐ 아니오
기타 확인 사항	☐ 상위 법령을 일탈하여 새로운 규제를 신설·강화하거나 민원인을 구속하는 내용이 있습니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☞ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 상위법령 일탈 내용을 삭제하시고 지침서·안내서 제·개정 절차를 진행하시기 바랍니다.	
상기 사항에 대하여 확인하였음.		
2017년 9월 7일		
담당자 확 인(부서장)		고 경 육 이 종 권

이 안내서는 화장품 안자극 동물대체시험법(단시간 노출법, STE) 가이드라인에 대하여 알기 쉽게 설명하거나 식품의약품안전처의 입장을 기술한 것입니다.

본 안내서는 대외적으로 법적 효력을 가지는 것이 아니므로 본문의 기술방식('~하여야 한다' 등)에도 불구하고 민원인 여러분께서 반드시 준수하셔야 하는 사항이 아님을 알려드립니다. 또한, 본 안내서는 2017년 9월 7일 현재의 과학적·기술적 사실 및 유효한 법규를 토대로 작성되었으므로 이후 최신 개정 법규 내용 및 구체적인 사실관계 등에 따라 달리 적용될 수 있음을 알려드립니다.

※ "민원인 안내서"란 대내외적으로 법령 또는 고시·훈령·예규 등을 알기 쉽게 풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전처의 입장을 기술하는 것 (식품의약품안전처 지침서등의 관리에 관한 규정 제2조)

※ 본 안내서에 대한 의견이나 문의사항이 있을 경우 식품의약품안전평가원 독성평가연구부 특수독성과에 문의하시기 바랍니다.

전화번호: 043-719-5152, 5155

팩스번호: 043-719-5150

제·개정 이력

연 번	제·개정 번호	승인일자	주요내용
1	안내서-0789-01	2017. 9. 7.	화장품 안자극 동물대체시험법(단시간 노출법, STE) 가이드라인 제정

목 차

I. 개요	6
II. 시험원리	6
III. 제한점 및 고려사항	7
IV. 시험방법	7
V. 인정요건	9
VI. 시험결과 및 보고	10
- 별첨 1 : 번역본	
- 별첨 2 : 원문	

화장품 안자극 동물대체시험법(단시간 노출법, STE) 가이드라인

I. 개요

단시간 노출법(Short Time Exposure, STE)은 시험물질이 토끼 각막 세포주인 Statens Seruminstitut Rabbit Cornea (SIRC) 세포에 미치는 세포독성을 근거로 하여 1) 심한 안 손상을 유발하는 물질 또는 2) 안자극 또는 심한 안 손상으로 분류되지 않는 물질을 식별하는데 사용되는 체내(*in vitro*) 안자극 시험방법이다.

시험물질을 생리식염수, 5% 디메틸 설펍사이드(dimethyl sulfoxide, DMSO)가 함유된 생리식염수 또는 미네랄 오일에 용해하거나 현탁시켜 5%, 0.05% 시험용액을 조제한 후, SIRC 세포에 그 시험용액을 5분간 노출시키고 MTT assay를 통해 용매대조군 대비 시험물질 처리군의 상대적인 세포생존율을 측정하여 안자극성을 평가한다.

본 시험법을 일상적으로 사용하는 실험실은 가이드라인에서 제시된 11개의 숙련도 물질을 사용하여 기술적 숙련도를 입증해야 하고, 가이드라인에서 제시하고 있는 인정요건 모두를 만족시키는 결과 값만이 유효한 것으로 인정된다.

시험결과 판정은 시험물질이 0.05% 및 5% 두 농도에서 세포생존율이 70% 이하를 나타내면 심한 안 손상을 유발하는 물질(UN GHS Category 1)로 분류하고, 두 농도 모두에서 세포생존율이 70%를 초과하면 안자극 또는 심한 안 손상으로 분류되지 않는 물질(UN GHS No Category)로 판정한다.

II. 시험원리

본 시험법은 SIRC 세포에 5% 및 0.05%의 시험용액을 5분간 노출시킨 후, 용매대조군 대비 시험물질 처리군의 상대적인 세포생존율을 MTT assay를 통해 정량적으로 측정하여 감소된 세포생존율의 결과에 따라 안 손상을 예측하는 방법이다. 물질이 각막 상피 세포에 미치는 세포독성은 각막 상피의 손상과 안자극으로 이어지는 중요한 작용기전(mode of action, MOA)으로 생각되기 때문에 세포독성에 근거하여 안자극성을 평가하게 된다. 이 시험법의 특징인 단시간 노출(5분)은 토끼의 눈에 투여되는 용액의 80%가 3분~4분 안에 결막낭을 통해 배출되고, 사람의 눈에 투여되는 용액의 80% 이상이 1분~2분 안에 배출된다는 보고에 근거하여 한 것이다.

III. 제한점 및 고려사항

본 시험법은 생리식염수, 5% DMSO가 함유된 생리식염수, 또는 미네랄 오일에 적어도 5분 동안 용해되지 않거나 균일하게 현탁되지 않는 시험물질에는 적합하지 않다. 또한 계면활성제 성분이 포함되지 아니한 고체물질(물질 및 혼합물)과 휘발성이 강한 물질(증기압이 6 kPa 이상)에 사용하는 것은 적절하지 않다.

본 시험법은 안자극(UN GHS Category 2)[즉, 안자극(Category 2A) 및 약한 안자극(Category 2B)] 시험물질을 식별하는데 사용될 수 없으며, 이 시험법으로 심한 안 손상을 유발하는 물질(Category 1)이나 안자극 또는 심한 안 손상으로 분류되지 않는 물질(No Category)로 예측할 수 없는 경우에는 확실한 분류를 위해 추가시험을 수행해야 한다.

규제 목적으로 혼합물에 대한 시험결과를 얻기 위해 이 시험법을 사용할 경우, 이 시험법이 그 목적에 적합한 결과를 제공할 수 있을지 그 적용가능성과 적합성에 대한 타당성을 고려해야 한다.

본 시험법은 심한 안 손상을 유발하는 물질(Category 1)을 구별하기 위해 사용되었을 때 정확도는 83%(104/125), 위양성율은 1%(1/86), 위음성율은 51%(20/39)이며, 안자극이나 안 손상으로 분류되지 않는 물질(No Category)을 구별하기 위해 사용되었을 때, 정확도는 85%(110/130), 위양성율은 19%(11/57), 위음성율은 12%(9/73)을 나타내었다.

IV. 시험방법

4.1. 세포배양

SIRC 세포를 Eagle's minimum essential medium (MEM) 배지[10% 소 태아 혈청(fetal bovine serum, FBS), 2mM L-glutamine, 50 - 100 units/mL 페니실린(penicillin) 및 50 - 100 $\mu\text{g/mL}$ 스트렙토마이신(streptomycin) 함유]에서 분주한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양한다. 세포는 시험에 사용되기 전에 2~3계대가 되도록 하고, 해동 후 25계대를 초과되지 않도록 하며, 96 well plate에 적당한 밀도(4일 배양의 경우 6×10^3 cells/well, 5일 배양의 경우 3×10^3 cells/well)로 200 μL 씩 분주하여 4~5일 배양 후 시험을 수행하도록 한다.

4.2. 시험물질 및 대조물질 조제

시험물질의 용매로서는 시험물질의 용해도에 따라 생리식염수 > 5% DMSO가 함유된 생리식염수 > 미네랄 오일 순으로 선택하여 사용하며, 시험물질을 5% (w/w)을 조제한 후 10배 연속희석하여 0.5%, 및 0.05%의 농도로 준비한다(시험물질은 5%와 0.05%만 사용). 시험물질 중 단일성분물질, 다성분물질 및 혼합물은 원 물질(neat substance)로 간주하

여 순도와 관계없이 제시된 농도로 조제하여 사용한다. 양성대조군으로 0.01% 소듐라우릴설페이트(Sodium lauryl sulfate, SLS, CAS No. 67-68-5)가 함유된 생리식염수를 사용하며, 양성대조군의 세포생존율을 계산하기 위해 매 시험마다 생리식염수 대조군을 포함한다. 매 실험마다 배지대조군과 용매대조군을 세포에 노출시켜 사용된 용매가 SIRC 세포의 생존율에 영향을 미치는 지를 확인한다. 흡광도 측정 시 필요한 공시험(blank)는 세포가 없는 well에 칼슘 및 마그네슘을 포함하지 않는 인산염완충액(phosphate buffered saline, PBS)을 첨가하여 얻어진 값으로 한다.

4.3. 시험물질 및 대조물질의 적용

5% 또는 0.05% 농도의 시험물질 용액, 배지대조군, 용매대조군 및 양성대조군을 well 당 200 μ L씩 처리한 후, 실온에서 5분 동안 노출시킨다. 각각 3 well씩 실시하며, 독립적으로 3회 반복실험(n=9)을 실시한다.

4.4. 세포생존율 측정

시험물질을 노출시킨 다음, 세포는 200 μ L의 PBS로 2회 세척하고 200 μ L의 MTT 용액(0.5 mg MTT/mL 배양 배지)을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 2시간 동안 배양한다. MTT 용액을 제거한 다음, 0.04 N 염산-이소프로판올 200 μ L을 추가하고 실온에서 차광한 뒤 60분 동안 교반하여 MTT 포르마잔(formazan)을 추출한다. 그리고 추출된 용액을 570 nm에서 흡광도를 측정한다.

$$\text{세포생존율(\%)} = \frac{\text{시험물질의 OD}_{570} - \text{Blank OD}_{570}}{\text{용매대조군의 OD}_{570} - \text{Blank OD}_{570}} \times 100$$

각 시험물질과 용매대조군에 대한 3 well의 산술평균을 이용하여 상대적인 세포생존율의 산술평균을 계산하며, 독립적으로 3회 반복실험을 통해 얻어진 세포생존율의 산술평균을 계산하여 최종적인 세포생존율을 구한다.

4.5. 숙련도 시험 수행

본 시험법을 이용하여 시험물질의 안자극을 평가하기 전에 본 가이드라인에서 제시하는 11개의 숙련도 물질(별첨 1의 표1 참조)을 대상으로 시험을 수행하여 제시된 결과값(UN GHS 분류)과 동일한 결과를 얻음으로써 실험실의 기술적 숙련을 입증하여야 한다.

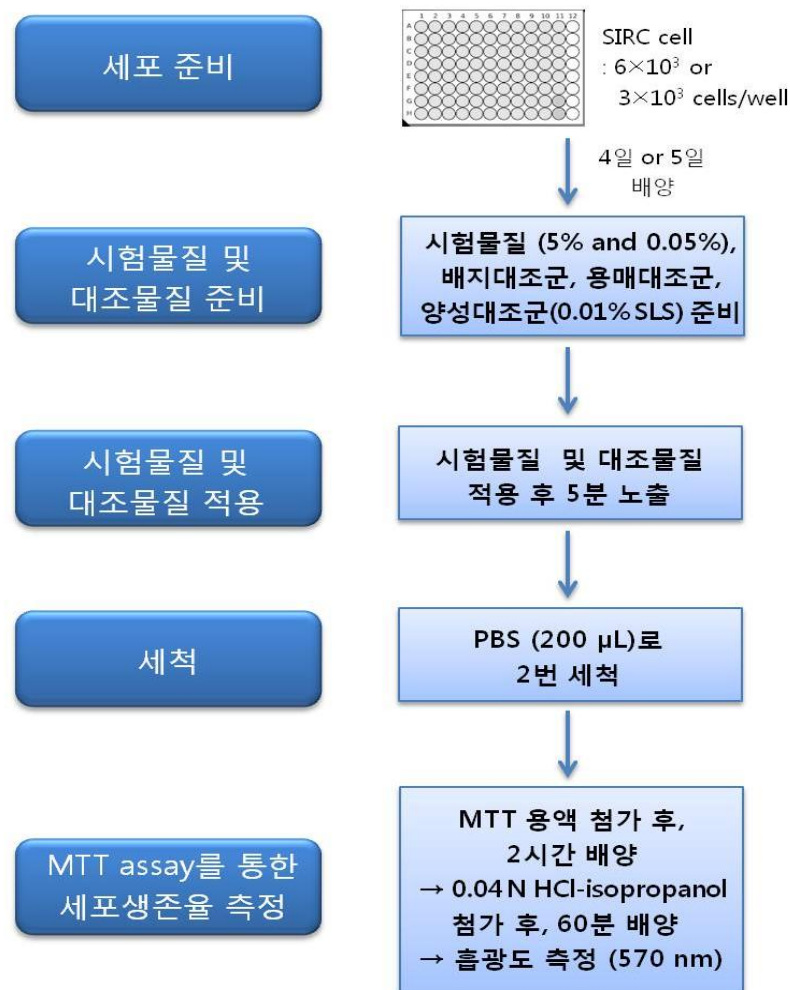


그림 1. 단시간 노출법(Short Time Exposure) 절차

V. 인정요건

다음의 기준이 모두 충족되어야 하며, 이러한 기준 중 하나 이상 충족되지 않는 경우, 그 결과는 폐기하고 다시 독립적으로 3회 반복실험을 수행해야 한다.

- 배지대조군의 흡광도에서 공시료의 흡광도를 뺀 값이 0.3 이상이어야 한다.
- 용매대조군의 생존율은 배지대조군 생존율과 비교하여 80% 이상이어야 한다.
- 양성대조군의 세포생존율은 실험실 데이터 평균값 $\pm$ 2배 표준편차(2 standard deviations, 2SD) 이내에 있어야 한다.
- 독립적으로 3회 반복실험에서 도출된 최종 세포생존율의 표준편차는 시험물질의 농도인 5% 및 0.05%에서 모두 15% 미만이어야 한다.

VI. 시험결과 및 보고

세포생존율을 용매대조군(상대적인 생존율)과 비교하여 눈에 대한 화학물질의 잠재적인 유해성을 평가한다. 5%와 0.05% 농도 모두에서 세포생존율이 ($\leq$) 70% 이하일 경우, 시험물질은 심한 안 손상을 유발하는 물질(Category 1)로 분류한다. 반대로 5%와 0.05% 농도 모두에서 세포생존율이 ($>$) 70%를 초과할 경우, 시험물질은 안자극 또는 심한 안 손상으로 분류되지 않는 물질(No Category)로 분류한다.

세포생존율		UN GHS 분류
5% 시험물질	0.05% 시험물질	
$> 70\%$	$> 70\%$	No Category
$\leq 70\%$	$> 70\%$	예측할 수 없음
$\leq 70\%$	$\leq 70\%$	Category 1

시험보고서는 시험물질 및 대조물질에 대한 특징 및 전처리 방법, 시험방법 조건 및 절차를 제시해야하며, 시험물질, 대조물질 및 시험 농도에 대해 3개 well에서 얻어진 각각의 OD 값, 각각의 독립적 반복실험의 산술평균 OD 값, 세포 생존율(%), 3회 반복 실험에서 얻어진 최종 세포생존율(%) 및 표준편차(SD)를 나타내야 하며, 결과에 대한 토의 및 결론 등을 포함해야 한다.

별첨 1. 번역본(OECD TG 491)

체외 단시간 노출 시험법(STE)

Short Time Exposure *in vitro* Test Method

I. 서론

1. 단시간 노출법(Short Time Exposure, STE) 시험법은 UN의 화학물질의 분류 및 표시에 관한 국제조화시스템(UN GHS)에 따라 심한 안 손상을 유발하는 화학물질(물질 및 혼합물) 및 안자극 또는 심한 안 손상으로 분류되지 않는 화학물질에 대한 유해성 분류와 표시를 위해 특정 조건과 제한 조건 하에서 활용될 수 있는 체외(*in vitro*) 시험법이다⁽¹⁾.

2. 수년간 눈에 대한 화학물질의 잠재적인 유해성은 주로 토끼를 이용한 체내(*in vivo*) 안점막자극시험(TG 405)을 활용해 평가되어 왔다. 다양한 화학물질들에 의해 유발될 수 있는 모든 범위의 심한 안 손상/안자극 반응을 예측하기 위해 하나의 체외 시험법으로는 토끼를 이용한 체내 안점막자극시험을 완전히 대체할 수 없다는 것이 일반적인 견해이다. 그러나 (단계적인) 시험전략 내에서 여러 개의 대체 시험법을 전략적으로 조합하여 수행할 경우 토끼를 이용한 안점막자극시험을 완전히 대체할 수 있을 것이다⁽²⁾. 하향식 접근방식(Top-down approach)은 기존 정보에 근거하여 강한 안자극을 일으키거나 심한 안 손상을 유발할 것으로 예상되는 화학물질을 시험하기 위해 설계되었다. 반대로 상향식 접근방식(Bottom-up approach)은 기존 정보에 근거하여 분류가 필요할 정도로 충분히 안자극을 유발하지 않을 것으로 예상되는 화학물질의 시험을 위해 설계되었다. 본 시험법이 토끼를 이용한 체내 안점막자극시험을 완전히 대체한다고는 여겨지지 않지만, 하향식/상향식 접근방식과 같은 규제 분류와 표시를 위한 단계적 시험전략의 일환으로 활용될 수 있으며 추가시험 없이 (i) 심한 안 손상을 유발하는 물질(UN GHS Category 1)과 (ii) 안자극 또는 심한 안 손상으로 분류되지 않는 물질(고 휘발성 물질 및 계면활성제 이외 모든 고체 물질 제외)(UN GHS No Category)을 식별하기 위한 방법으로 적절하다⁽¹⁾⁽²⁾. 그러나 본 시험법을 이용하여 심한 안 손상을 유발하는 물질(UN GHS Category 1) 또는 안자극 또는 심한 안 손상을 분류되지 않는 물질(UN GHS No Category)로 예측할 수 없는 경우, 확실한 분류를 위해 추가시험을 수행해야 한다. 또한, UN GHS 외 다른 분류체계 하에서 상향식 접근방식으로 본 시험법을 이용할 경우 해당 규제 당국과 협의해야 한다.

3. 본 시험법 가이드라인(TG)의 목적은 STE 시험법에서의 세포독성 유발 능력에 근거하여 시험물질이 눈에 미치는 유해성을 평가하기 위해 활용되는 절차를 설명하기 위한 것이다. 화학물질이 각막 상피세포에 미치는 세포독성 효과는 각막 상피의 손상과 안자극으로 이어지는 중요한 작용기전(MOA)이다. 본 시험법에서 세포생존율은 생염료인 MTT [(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide로도 알려짐]가 효소반응에 의해 살아있는 세포에서 청색의 MTT 포르마잔 염으로 전환되는데 이를 세포에서 추출하여 정량적으로 측정하는 것이다⁽³⁾. 얻은 세포생존율을 용매대조군(상대적인 생존율)과

비교하여 시험물질의 눈에 대한 잠재적인 유해성을 평가한다. 5%와 0.05% 농도 모두에서 세포생존율이 ($\leq$) 70% 이하일 경우 시험물질은 심한 안 손상을 유발하는 물질(UN GHS Category 1)로 분류한다. 반대로 5%와 0.05% 농도 모두에서 세포생존율이 ($>$) 70%를 초과할 경우 시험물질은 안자극 또는 심한 안 손상으로 분류되지 않는 물질(UN GHS No Category)로 분류한다.

4. 본 시험법 가이드라인에서 “시험물질(test chemical)”은 시험되는 물질을 의미하며, 이러한 시험물질은 물질 및/또는 혼합물을 평가하는 STE 시험법의 적용가능성을 의미하지 않는다. 용어 정의는 부록1에 기술되어 있다.

II. 초기 고려사항과 제한점

5. 본 시험법 가이드라인은 Kao Corporation이 개발한 프로토콜을 기반으로 한다⁽⁴⁾. 이 프로토콜은 일본동물대체시험법학회(JSAAE) 검증위원회(Validation Committee of the Japanese Society for Alternative to Animal Experiments, JSAAE)⁽⁵⁾ 및 일본 동물대체시험법검증센터(Japanese Center for the Validation of Alternative Methods: JaCVAM)⁽⁶⁾가 수행한 두 검증연구의 주제였다. NICEATM/ICCVAM에서 이 시험법에 대한 검증연구 보고 및 배경 검토 문서를 근거로 전문가 평가(peer review)를 수행했다⁽⁷⁾.

6. 심한 안 손상을 유발하는 화학물질(물질 및 혼합물) (UN GHS Category 1)⁽¹⁾을 식별할 경우, 본 시험법을 125개 화학물질(물질 및 혼합물 포함)에 적용해 얻은 자료에 따르면 토끼를 이용한 체내 안점막자극시험과 비교했을 때, 본 시험법의 정확도는 83%(104/125), 위양성율은 1%(1/86), 위음성율은 51%(20/39)로 나타났다⁽⁷⁾. 본 시험법의 위음성율은 현재 맥락에서 그리 중요하지 않다. 왜냐하면 5% 농도에서 세포생존율 $\leq$ 70%를 유도하고 0.05% 농도에서 세포생존율 $>$ 70%를 유도하는 모든 시험물질의 경우 규제요건에 맞게 현재 권고되는 증거 가중치(weight of evidence) 접근방식에 따른 순차적 시험전략을 사용하여 적절하게 검증된 다른 체외 시험법 또는 최후의 수단으로 토끼를 이용한 체내 안점막자극시험을 추가적으로 수행해야 하기 때문이다⁽¹⁾⁽⁸⁾. 혼합물 시험에 대한 시험결과가 제한적으로 존재하긴 하지만, 주로 단일성분 물질이 시험되었다. 그럼에도 불구하고 이 시험법은 기술적으로는 다성분 물질과 혼합물을 시험하는 데 적용할 수 있다. 그러나 규제 목적으로 혼합물에 대한 시험결과를 도출하기 위해 본 시험법 가이드라인을 사용할 경우, 본 시험법이 그러한 목적에 적합한 결과를 제공할 수 있을지 그 적용 가능성과 적합성에 대한 타당성을 고려해야 한다. 이러한 고려사항은 혼합물 시험에 대한 규제요건이 있을 때에는 필요하지 않다. 본 시험법을 심한 안 손상을 유발하는 물질(UN GHS Category 1)을 식별하기 위해 사용할 경우 다른 단점은 나타나지 않았다. 연구자들은 본 시험법을 시험물질에 사용할 수 있으며, 5%와 0.05% 농도에서 세포생존율이 $\leq$ 70%인 경우 심한 안 손상을 나타내는 지표로 받아들이고 추가시험 없이 UN GHS Category 1로 분류한다.

7. 안자극 또는 심한 안 손상으로 분류되지 않는 화학물질(물질 및 혼합물)(UN GHS No Category)을 식별할 경우, 본 시험법을 130개 화학물질(물질 및 혼합물 포함)에 적용해서 얻은

자료에 따르면 토끼를 이용한 체내 안점막자극시험과 비교했을 때, 본 시험법의 정확도는 85%(110/130), 위음성율은 12%(9/73), 위양성율은 19%(11/57)로 나타났다⁽⁷⁾. 고 휘발성 물질 및 계면활성제 이외의 고체 물질을 자료 세트에서 제외할 경우, 정확도는 90%(92/102), 위음성율은 2%(1/54), 위양성율은 19%(9/48)로 향상된다⁽⁷⁾. 따라서 안자극 또는 심한 안 손상의 분류되지 않는 시험물질(UN GHS No Category)을 식별하기 위해 본 시험법을 사용할 경우, 잠재적인 단점은 i) 증기압이 6kPa 이상인 고 휘발성 물질 및 ii) 계면활성제 및 계면활성제로만 이루어진 혼합물 이외의 고체 화학물질(물질과 혼합물)에 대한 위음성율이 높다는 점이다. 이러한 화학물질들은 본 시험법의 적용 범위(applicability domain)에서 제외된다⁽⁷⁾.

8. 본 시험법을 통해 생성된 데이터 세트는 6항과 7항에서 언급한 화학물질 외에도 40가지 혼합물에 대한 자체 자료를 포함하며, UN GHS 분류체계에 따라 분류되지 않는 혼합물을 식별할 경우, 체내 Draize 안점막자극시험과 비교했을 때, 정확도는 88%(35/40), 위양성율은 50%(5/10), 위음성율은 0%(0/30)로 나타난다⁽⁹⁾. 따라서 본 시험법은 상향식 접근방식으로 안자극 또는 심한 안 손상으로 분류되지 않는 혼합물(UN GHS No Category)을 식별하는데 적용할 수 있지만, 계면활성제만으로 구성된 고체 혼합물 이외의 고체 혼합물에는 적용할 수 없다. 또한, 증기압이 6 kPa 이상인 물질을 함유한 혼합물은 과소평가되지 않도록 주의 깊게 평가되어야 하며 사례별로 판단해야 한다.

9. 본 시험법은 안자극[UN GHS Category 2, 안자극(UN GHS Category 2A), 또는 약한 안자극(UN GHS Category 2B)] 시험물질을 식별하는 데 사용될 수 없다. 상당수의 심한 안 손상을 유발하는 시험물질(UN GHS Category 1)이 안자극(UN GHS Category 2), 안자극(UN GHS Category 2A), 또는 약한 안자극(UN GHS Category 2B)으로 과소평가하게 되고 안자극 또는 심한 안 손상으로 분류되지 않는 시험물질(UN GHS No Category)이 안자극(UN GHS Category 2), 안자극(UN GHS Category 2A), 또는 약한 안자극(UN GHS Category 2B)으로 과대평가되기 때문이다⁽⁷⁾. 이러한 목적으로 다른 적절한 시험법을 이용한 추가 시험이 필요하다.

10. 본 시험법은 생리식염수, 5% 다이메틸 설펍사이드(dimethyl sulfoxide, DMSO)가 함유된 생리식염수 또는 미네랄 오일에 적어도 5분 동안 용해되거나 균일하게 현탁되는 시험물질에 적합하지만, 이러한 용매에 5분 동안 용해되지 않거나 균일하게 현탁되지 않는 시험물질에는 적합하지 않다. 본 시험법은 단시간 노출이기 때문에 미네랄 오일 사용이 가능하며, 위의 3가지 용매 중 하나 이상에서 혼합될 수 있다면 비수용성 시험물질(예: 긴사슬 지방 알코올류 또는 케톤류)이 눈에 미치는 유해성을 예측하는 데 적합하다⁽⁴⁾.

11. 본 시험법 가이드라인에서 “시험물질(test chemical)”은 시험되는 물질¹⁾을 의미하며, 본 시험법의 적용성과는 관련이 없다.

1) 2013년 6월, 합동회의에서 시험대상을 언급할 때 “시험물질”이라는 용어를 신규 및 개정판 시험법 가이드라인에서 가능한 한 보다 일관되게 사용하기로 합의했다.

III. 시험원리

11. 본 시험법은 세포독성 기반 체외 시험법이며, 96-well polycarbonate 마이크로 플레이트에서 배양된 SIRC 세포의 단층(confluent monolayer)에서 수행된다⁽⁴⁾. 시험물질에 5분간 노출 후, 세포독성은 MTT assay를 이용하여 SIRC 세포의 상대적인 생존율로 정량적으로 측정된다⁽⁴⁾. 감소된 세포생존율은 안 손상으로 이어질 잠재적 부작용을 예측하는 데 사용된다.

12. 토끼의 눈에 투여되는 용액의 80%는 3분에서 4분 안에 결막낭을 통해 배출되는 반면 사람의 눈에 투여되는 용액의 80% 이상은 1분에서 2분 안에 배출된다고 보고되었다⁽¹⁰⁾. 본 시험법은 이 노출 시간의 근사치를 적용하도록 설계되었다. 본 시험법은 시험물질에 5분간 노출된 후 SIRC 세포의 손상 범위를 평가하기 위한 평가항목(end point)으로 세포독성을 이용한다.

IV. 숙련도 확인

13. 본 시험법 가이드라인에서 설명한 STE 시험법을 일상적으로 사용하기 전에 실험실은 표 1에서 권고하는 11개의 물질을 대상으로 실험을 수행하여 정확하게 분류함으로써 기술적 숙련도를 입증하여야 한다. 이 물질들은 토끼를 이용한 체내 안점막자극시험(TG 405) 결과와 UN GHS 분류체계를 바탕으로 심한 안 손상이나 안자극에 대한 반응의 전체 범위를 포함할 수 있도록 선정되었다⁽¹⁾. 다른 선정 기준으로는 해당 물질이 구매 가능하며, 체내 자료와 본 시험법으로 얻은 신뢰할만한 체외 자료가 있어야 한다는 점이 포함되었다⁽³⁾. 제시된 시험물질을 구할 수 없거나 다른 정당한 이유로 사용할 수 없는 경우, 적절한 체내 및 체외 참고 자료가 있는 다른 시험물질을 사용할 수 있지만 여기서 명시된 기준을 충족해야 한다.

표 1: 체외 단시간 노출 시험법의 숙련도 확인용 물질

물질	CASRN	화학 계열 ¹	물리적 상태	체내 UN GHS Cat. ²	용매	UN GHS 분류
Benzalkonium chloride (10%, aqueous)	8001-54-5	Onium compound	액체	Category 1	생리 식염수	Category 1
Triton X-100 (100%)	9002-93-1	Ether	액체	Category 1	생리 식염수	Category 1
Acid Red 92	18472-87-2	Heterocyclic compound; Bromine compound; Chlorine compound	고체	Category 1	생리 식염수	Category 1
Sodium hydroxide	1310-73-2	Alkali; Inorganic chemical	고체	Category 1 ³	생리 식염수	Category 1
Butyrolactone	96-48-0	Lactone; Heterocyclic compound	액체	Category 2A	생리 식염수	예측불가

1-Octanol	111-87-5	Alcohol	액체	Category 2A/B ⁴	미네랄 오일	예측불가
Cyclopentanol	96-41-3	Alcohol; Hydrocarbon, cyclic	액체	Category 2A/B ⁵	생리 식염수	예측불가
2-Ethoxyethyl acetate	111-15-9	Alcohol; Ether	액체	No Category	생리 식염수	No Category
Dodecane	112-40-3	Hydrocarbon, acyclic	액체	No Category	미네랄 오일	No Category
Methyl isobutyl ketone	108-10-1	Ketone	액체	No Category	미네랄 오일	No Category
n,n-Dimethylguanidine sulfate	598-65-2	Amidine; Sulfur compound	고체	No Category	생리 식염수	No Category

약어: CAS RN = Chemical Abstracts Service Registry Number

- ¹ 기존 NICEATM 간행물에서 얻은 정보를 이용하여 화학적 분류가 이루어졌으며, 이러한 정보를 이용할 수 없는 경우에는 National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH®)(ChemIDplus® [National Library of Medicine]을 통해 <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>에서 이용가능)와 NICEATM가 만든 구조결정을 이용했다.
- ² 토끼를 이용한 체내 안점막자극시험(OECD TG 405) 결과와 UN GHS 분류체계에 근거한다⁽¹⁾.
- ³ Cat.1의 분류는 100% 수산화나트륨(OECD TG 435의 피부 부식 가능성이 있는 숙련도 확인용 물질로 제시됨)의 피부 부식 가능성과 UN GHS Category 1의 기준에 근거한다⁽¹⁾.
- ⁴ 2A 또는 2B로의 분류는 이 두 카테고리를 구별하기 위한 UN GHS의 분류 기준의 해석에 기반으로 하여 결정된다. 즉 시험 7일 차에 6마리 동물 중 2마리 혹은 6마리 중 4마리가 독성영향을 나타내면 Category 2A로 분류된다. 모든 체내 자료 세트는 두 차례의 시험을 포함하며, 각 실험마다 3마리의 동물이 이용되었다. 첫 번째 실험에서 3마리 동물 중 2마리가 7일 차에 영향을 나타내 Category 2A로 분류되었다⁽¹¹⁾. 반면 두 번째 실험에서 3마리 동물 모두에서 모든 종말점이 7일 이내에 "0" 점으로 회복되어 Category 2B로 분류되었다⁽¹²⁾.
- ⁵ 2A 또는 2B로의 분류는 이 두 카테고리를 구별하기 위한 UN GHS의 분류 기준의 해석에 기반으로 하여 결정된다. 즉 시험 7일 차에 3마리 동물 중 1마리 혹은 3마리 중 2마리가 독성영향을 나타내면 Category 2A로 분류된다. 모든 체내 시험은 3마리의 동물을 포함했다. 한 마리의 동물에서 각막 혼탁과 결막 충혈을 제외하고 모든 종말점이 7일 이내에 0점으로 회복되었다. 7일까지 완전히 회복되지 않은 한 마리의 동물은 (7일 차에) 각막 혼탁점수가 1점, 결막 충혈 점수가 1점이었고, 14일 차에 완전히 회복되었다⁽¹¹⁾.

V. 시험방법

가. 세포 단층 준비

14. 본 시험법을 수행할 경우 토끼 각막 세포주인 SIRC를 이용해야 한다. SIRC 세포주는 American Type Culture Collection CCL60과 같이 검증된 세포 은행에서 얻도록 권장된다.

15. SIRC 세포를 10% 소 태아 혈청(FBS), 2 mM L-glutamine, 50 - 100 units/mL 페니실린 (penicillin) 및 50 - 100 µg/mL 스트렙토마이신(streptomycin)을 첨가된 Eagle's minimum essential medium (MEM) 배지에 분주하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양한다. 배양 플라스크에서 세포는 세포 스크레이퍼를 사용여부와 무관하게 trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid 용액을 처리하여

분리한다. 세포는 일상적으로 시험에 사용되기 전에 배양 플라스크에서 증식(예: 2에서 3세대) 되어야 하며, 해동 후 25세대를 초과해서는 안 된다.

16. 그 다음 본 시험에 사용될 세포를 96-well 플레이트에 분주한다. 분주된 세포의 권장 밀도는 4일 동안 배양하는 경우 well 당 6.0×10^3 cells, 또는 분주한 후 5일 동안 배양하는 경우 well 당 3.0×10^3 cells로 하며, 배양량은 200 μ L로 한다. 본 시험에 사용할 세포는 적당한 밀도로 배양 배지에 분주하여 4일 또는 5일 배양 후, 시험을 수행할 무렵에 80% 이상 세포가 채워지도록 한다.

나. 시험물질과 대조물질의 적용

17. 시험물질을 용해 또는 현탁시키기 위해 첫 번째로 선택되는 용매는 생리식염수이다. 시험물질이 낮은 용해도를 나타내거나 생리식염수에서 적어도 5분 동안 용해되지 않거나 균일하게 현탁되지 않는 경우, 5% DMSO(CAS#67-68-5)가 함유된 생리식염수가 두 번째 용매로서 선택될 수 있다. 시험물질이 생리식염수나 5% DMSO가 함유된 생리식염수에서 5분 안에 용해되지 않거나 균일하게 현탁되지 않는 경우, 미네랄 오일(CAS#8042-47-5)이 세 번째 용매로 선택될 수 있다.

18. 시험물질을 선택된 용매에 균일하게 용해시키거나 현탁시켜 5% (w/w) 농도로 조제한 후, 각 단계에서 10배로 희석하여 0.5% 및 0.05% 농도를 조제한다. 각 시험물질은 5% 및 0.05% 농도로 시험한다. 96-well 플레이트에서 배양된 세포에 well 당 5% 또는 0.05% 농도의 시험물질 용액(또는 현탁액)을 200 μ L씩 첨가하여 실온에서 5분 동안 노출시킨다. 시험물질(단일성분 물질, 다성분 물질 또는 혼합물)은 원 물질(neat substance)로 간주하며 순도를 고려하지 않고 이 방법에 따라 희석하거나 현탁시킨다.

19. 15항에서 설명된 배양 배지는 독립된 반복실험마다 각 플레이트의 배지대조군으로 사용한다. 또한, 세포에 독립된 반복실험마다 각 플레이트의 용매대조군 시료를 세포에 노출시킨다. 17항에 제시된 용매들은 SIRC 세포생존율에 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다.

20. 본 시험법에서 0.01% 소듐라우릴설페이트(Sodium lauryl sulfate, SLS)가 함유된 생리식염수는 독립된 반복실험마다 각 플레이트의 양성대조군으로 사용한다. 양성대조군의 세포생존율을 계산하기 위해, 독립된 반복실험마다 각 플레이트에 생리식염수대조군을 포함해야 한다.

21. 공시료(blank)는 흡광도 보정을 하기 위해 필요하며, 세포가 없고 칼슘 및 마그네슘을 포함하지 않는 인산염완충액(PBS)을 well에 첨가하여 수행해야 한다.

22. 각 시료(5% 및 0.05%의 시험물질, 배지대조군, 용매대조군, 및 양성대조군)는 실온에서 5분 동안 200 μ L의 적절한 시험물질 또는 대조물질을 세포에 노출시켜며, 동일시료 당 3개 well을

사용하여 실험한다.

23. 기준물질은 특정 물질 또는 제품 분류가 알려지지 않은 물질에 대한 안자극을 평가하거나, 특정 자극 범위에서의 상대적인 안자극을 평가하는데 유용하다.

다. 세포생존율 측정

24. 시험물질을 노출시킨 후, 세포는 200 μ L의 PBS로 2회 세척하고 200 μ L의 MTT 용액(0.5 mg MTT/mL의 배양 배지)을 첨가하여 배양기에서 2시간 동안 반응시킨(37°C, 5% CO₂) 후, MTT 용액을 제거한 다음, 200 μ L의 0.04 N 염산-이소프로판올을 첨가하고 실온에서 차광한 뒤 60분 동안 배양하여 MTT 포르마잔(formazan)을 추출한다. 그리고 플레이트 리더(plate reader)로 570 nm에서 MTT 포르마잔 용액의 흡광도를 측정한다. 시험물질(색 간섭을 일으키거나 MTT의 직접적인 환원에 의해)의 MTT assay 간섭효과는 시험물질을 노출시킨 다음 세척을 한 이후에도 상당량의 시험물질이 시험계에 남아있는 경우에만 발생한다. 이러한 경우는 3D 인체각막이나 인체표피조직에 해당하지만 본 시험법에 사용되는 2D 세포배양은 이와 관련이 없다.

라. 결과의 해석과 예측 모델

25. 각 시험물질에 대한 흡광도(OD) 값은 용매대조군과 비교하여 세포생존율을 계산하는데 사용되며, 용매대조군의 세포생존율은 100%로 간주한다. 상대적인 세포생존율은 백분율로 나타내며, 시험물질의 OD 값 및 용매대조군의 OD 값에서 각각 공시료 OD 값을 뺀 후 시험물질의 OD 값을 용매대조군의 OD 값으로 나누어 구한 값이다.

$$\text{세포생존율(\%)} = \frac{\text{시험물질의 OD}_{570} - \text{Blank OD}_{570}}{\text{용매대조군의 OD}_{570} - \text{Blank OD}_{570}} \times 100$$

이와 유사하게, 각 용매대조군의 상대적인 세포생존율은 백분율로 나타내고 각 용매대조군의 OD 값 및 배지대조군의 OD 값에서 각각 공시료 OD 값을 뺀 후 용매대조군의 OD 값을 배지대조군의 OD 값으로 나누어 구한 값이다.

26. 각각 3개의 replicate well을 포함하여 독립적으로 3회 반복실험(n=9)을 실시한다. 각각의 독립적인 반복실험에서 각 시험물질과 용매대조군에 대한 3 well의 산술평균을 이용하여 상대적인 세포생존율의 산술평균을 계산한다. 최종 세포생존율은 독립적으로 3회 반복실험을 통해 얻어진 값의 산술평균으로 구한다.

27. 심한 안 손상을 유발하는 시험물질(UN GHS Category 1)과 안자극 또는 심한 안 손상에 대한 분류되지 않는 시험물질(UN GHS No Category)을 식별하기 위한 세포생존율 기준치(cut-off value)는 다음과 같다.

표 2: STE 시험법의 예측 모델

세포생존율		UN GHS 분류	적용가능성
5% 시험물질	0.05% 시험물질		
> 70%	> 70%	No Category	물질 및 혼합물. 다음은 예외 1) 압력이 6kPa ¹ 이상의 고 휘발성물질 2) 계면활성제와 계명활성제로만 이루어진 혼합물이 아닌 고체물질(물질 및 혼합물)
≤ 70%	≥ 70%	예측할 수 없음	적용할 수 없음
≤ 70%	≤ 70%	Category 1	물질 및 혼합물 ²

¹ 6 kPa보다 높은 증기압을 가진 물질을 포함하는 혼합물을 계산하는 경우 과소평가하지 않도록 신중을 기해야 하며 사례별 접근이 필요하다.

² 주로 단일성분 물질에서 얻은 결과를 기반으로 한 것이며 혼합물 시험에 관해서는 제한된 양의 자료가 존재한다. 그럼에도 불구하고, 본 시험법은 기술적으로는 다성분 물질과 혼합물 시험에 적용이 가능하다. 규제의 목적으로 시험결과를 얻기 위해 본 시험법을 혼합물에 적용할 경우, 본 시험법이 그러한 목적에 적합한 결과를 제공할 수 있을지, 적합하다면 그 이유는 무엇인지를 고려해야 한다. 이러한 고려는 이미 혼합물을 시험에 대한 규제요건이 있을 경우에는 필요하지 않다.

마. 허용 기준

28. 다음의 기준이 모두 충족되는 경우 시험결과는 허용할 수 있다고 간주된다.

- 배지대조군의 OD 값(배양 배지에 노출)에서 공시험 OD 값을 뺀 값이 0.3 이상이어야 한다.
- 용매대조군의 생존율은 배지대조군과 비교하여 80% 이상이어야 한다. 각각의 독립적 반복실험에서 여러 용매대조군이 사용되는 경우 얻어진 시험결과의 신뢰성을 입증하기 위해 각 용매대조군의 세포생존율은 80% 이상이어야 한다.
- 양성대조군의 세포생존율(0.01% SLS)은 실험실 데이터 평균값 $\pm$ 2배 표준편차(2SD) 이내이어야 한다. 양성대조군에 대한 상위 및 하위 허용기준은 3개월마다 또는 시험이 드물게(1개월 1번미만) 실시되는 실험실에서는 허용될만한 시험이 실시될 때마다 자주 업데이트되어야 한다. 첫 번째 실험을 통해 하나의 내부 분포가 수립되지만, 실험실이 통계적으로 확실한 양성대조군 분포를 수립할 수 있는 충분한 수의 실험을 완수하지 못한 경우, 양성대조군의 상위 및 하위 허용기준은 시험법 개발자가 그들의 실험실 데이터 값으로 수립한 21.1%와 62.3% 값으로 사용한다.
- 독립적으로 3회 반복실험에서 도출한 최종 세포생존율의 표준편차는 5%와 0.05%의 시험물질 농도에서 모두 15% 미만이어야 한다.

이러한 기준 중 하나 또는 여러 개가 충족되지 않는 경우 그 결과는 폐기하고 다시 3회 독립적 반복실험을 수행해야 한다.

VI. 시험결과 및 보고

가. 데이터

29. 동일시료의 3개 well에 대한 데이터(세포생존율 값)와 전체평균, SD와 분류를 보고해야 한다.

나. 시험보고서

30. 시험보고서는 다음의 정보를 포함하여야 한다.

- 시험물질과 대조물질

- 단일성분물질: IUPAC나 CAS 명칭, CAS 등록번호, SMILES 나 InChI 코드, 구조식 및 기타 식별자료 등과 같은 시험물질의 식별정보
- 다성분물질 UVCB 및 혼합물: 물질 정보(위 참조), 순도, 양적 비율, 구성성분의 관련 물리화학적 성질 등 알려진 특성
- 알려진 물리적 상태, 휘발성, pH, LogP, 분자량, 화학적 분류, 시험수행과 관련된 추가적인 물리화학적 성질
- 가능하다면 순도 및 불순물에 대한 고유 정보
- 해당하는 경우 시험 전처리 방법(예: 가온, 분쇄)
- 알려진 보관 조건 및 안정성

- 시험방법 조건 및 절차

- 시험의뢰기관, 시험기관 및 연구 책임자의 이름과 주소
- 사용한 시험법에 대한 설명
- 사용된 세포주, 출처, 계대수, 시험에 사용된 세포의 밀도

- 사용된 시험절차 내역
- 사용된 반복 실험 및 반복측정 횟수
- 사용된 시험물질 농도(권장 농도와 다를 경우)
- 각 시험물질의 용매선정에 대한 근거
- 시험물질 노출기간(권장 노출기간과 다를 경우)
- 시험절차 상에서 변경된 모든 사항에 대한 설명
- 사용된 평가 및 결정 기준에 대한 설명
- 과거 양성대조군 평균 및 표준편차에 대한 참조
- 시험법 수행에 있어서의 숙련도 입증(숙련도 확인용 시험물질 시험을 통한) 또는 지속적인 시험법 수행의 재현성 입증

● 시험결과

- 각 시험물질, 대조물질들 및 사용된 시험농도에 대해, 동일시료의 3개 well의 OD 값, 독립적 반복실험의 산술평균 OD 값, 독립적인 반복실험의 세포생존율(%), 3회 독립적 반복실험의 산술평균을 통해 얻어진 최종 세포생존율(%) 및 SD는 표 형식으로 나타낸 시험결과
- 시험 허용기준의 적절성을 입증하기 위한 배지, 용매, 양성대조군의 시험 결과
- 관찰된 다른 영향에 대한 설명
- 사용된 예측모델/결정기준에 관한 전반적인 결과

● 결과 토의

● 결론

VII. 참고문헌

1. United Nations UN (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals(GHS). Fifth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1.
Available at: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html].
2. Scott L, et al. (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9.
3. Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to 7 Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
4. Takahashi Y, et al. (2008). Development of the Short Time Exposure (STE) Test: an *In Vitro* Eye Irritation Test Using SIRC Cells. *Toxicol. In Vitro* 22,760-770.
5. Sakaguchi H, et al. (2011). Validation Study of the Short Time Exposure (STE) Test to Assess the Eye Irritation Potential of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 25,796-809.
6. Kojima H, et al. (2013). Second-Phase Validation of Short Time Exposure Tests for Assessment of Eye Irritation Potency of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 27, pp.1855-1869.
7. ICCVAM (2013). Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document, NIH. Available at: [http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf].
8. OECD (2012). Test Guideline for Testing of Chemicals (No.405): Acute Eye Irritation/Corrosion.Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
9. Saito K, et al. (2015). Predictive Performance of the Short Time Exposure Test for Identifying Eye Irritation Potential of Chemical Mixtures.
10. Mikkelsen TJ, Chrai SS and Robinson JR. (1973). Altered Bioavailability of Drugs in the Eye Due to Drug-Protein Interaction. *J. Pharm Sci.*1648-1653.
11. ECETOC. (1998). Eye Irritation Reference Chemicals Data Bank. Technical Report (No. 48. (2)), Brussels, Belgium.
12. Gautheron P, et al. (1992). Bovine Corneal Opacity and Permeability Test: an *In Vitro* Assay of Ocular Irritancy. *Fundam Appl Toxicol.* 18, 442 - 449.

13. OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 34.). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

부록 1. 용어정의

정확도(Accuracy): 시험결과와 허용된 참고치의 일치 정도. 시험 수행에 대한 평가 척도이고 “상관성(relevance)”의 한 측면이다. 정확도는 정확하게 맞춘 시험결과의 비율을 의미하는 “일치도(concordance)”와 흔히 같은 의미로 쓰임⁽¹³⁾

기준물질(Benchmark substance): 시험물질의 비교기준으로 사용되는 물질. 기준물질은 다음의 특성을 가져야 한다. (i) 일관성 있고 신뢰할 수 있는 공급원; (ii) 시험되는 물질과 구조적, 기능적 유사성; (iii) 알려진 물리/화학적 특성; (iv) 알려진 효과 입증 자료; (v) 원하는 반응의 범위 내 알려진 효력

상향식 접근방식(Bottom-Up Approach): 안자극 또는 심한 안 손상을 유발하지 않는 물질에 대한 단계적 접근. 양성의 결과가 나오는 다른 물질로부터 음성의 결과가 나오는 분류가 필요하지 않은 물질을 구별하는 것으로 시작함

화학물질(Chemical): 물질 또는 혼합물

안자극(Eye irritation): 안구 앞면에 시험물질 적용 후 나타나는 변화로서 물질 적용 후 21일 이내 회복이 된다. “눈에 미치는 가역적 영향”과 “UN GHS Category 2”와 같은 의미로 사용됨⁽¹⁾

위음성율(False negative rate): 시험법에 의해 음성물질로 잘못 판정되는 모든 양성물질의 비율이며, 시험 수행 지표 중 하나

위양성율(False positive rate): 시험법에 의해 양성물질로 잘못 판정되는 음성물질의 비율이며, 시험법 수행 지표 중 하나

유해성(Hazard): 어떤 물질이 생명체, 생태계 또는 특정 인구집단에 노출될 때 위대한 영향을 줄 가능성이 있는 물질 또는 상황(situation)의 본질적인 특성

배지대조군(Medium control): 시험계의 모든 구성요소를 포함하는 처리되지 않은 군. 용매가 시험계와 상호작용을 하는지 확인하기 위해 이 샘플은 물질로 처리된 샘플 및 다른 대조군 샘플과 함께 실험됨

혼합물(Mixture): 서로 반응하지 않는 두 개 이상의 물질로 구성된 혼합물 또는 용액⁽¹⁾

단일성분물질(Mono-constituent substance): 정량적 구성으로 정의되며, 하나의 주요 구성성분이 최소 80% (w/w)이상으로 존재하는 물질

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

다성분물질(Multi-constituent substance): 정량적 구성으로 정의되며, 두 가지 이상의 주요성분의 양이 $\geq 10\%$ (w/w) 및 $< 80\%$ (w/w)인 물질. 다성분 물질은 생산과정의 산물이다. 혼합물과 다성분 물질의 차이는 혼합물은 두 가지 이상의 물질을 화학반응 없이 혼합하여 얻어지고, 다성분 물질은 화학반응의 산물임

OD: 흡광도 (Optical Density)

양성대조군(Positive control): 시험계의 모든 구성요소를 포함하고 양성반응을 유도한다고 알려진 물질을 처리한 군. 시간에 따른 양성대조군 반응의 변이성을 평가할 수 있으며, 양성반응의 범위가 초과해서는 안 됨

상관성(Relevance): 시험법과 관심 있는 결과 사이의 관계에 대한 기술. 시험법이 특정목적에 의미 있고 유용한지에 대한 기술. 상관성은 시험법이 알고자 하는 생물학적 반응을 정확하게 측정하고 예측하는지를 나타내며, 또한 시험법의 정확성(일치도)을 내포함⁽¹⁰⁾

신뢰도(Reliability): 동일한 시험방법에 따라 반복 시행하였을 때 동일 실험실과 다른 실험실에서 시험법을 재현할 수 있는 정도. 신뢰도는 실험실 내 실험실 간 재현성(reproducibility)과 실험실 내 반복성(repeatability)으로 평가됨⁽¹³⁾

민감도(Sensitivity): 시험 결과 양성/활성 시험물질이 양성/활성으로 정확하게 분류되는 비율. 시험물질의 분류를 결정하는 시험법에 대한 정확성의 척도이며 시험법의 상관성을 평가하는데 중요한 고려사항임⁽¹⁰⁾

심한 안 손상(Serious eye damage): 안구 앞면에 시험물질 적용 후 21일 이내에 회복되지 않는 안 조직 손상 또는 시력의 심한 손상으로, “눈에 미치는 비가역적 영향”과 “UN GHS Category 1” 으로 바꾸어 사용할 수 있음⁽¹⁾

용매/부형제대조군(Solvent/vehicle control): 용매나 부형제 등 시험계의 모든 요소를 포함하는 처리되지 않은 샘플. 물질로 처리된 샘플 및 다른 대조군 샘플과 함께 실험되며 동일한 용매나 부형제로 녹인 시험물질로 처리한 샘플의 기본반응(baseline response)을 정하기 위해 사용된다. 배지대조군과 함께 시험될 때, 용매/부형제 대조군 샘플은 용매나 부형제가 시험계와 상호작용을 하는지 보여줌

특이도(Specificity): 시험법으로 음성/비활성 시험물질이 음성/비활성으로 정확하게 분류되는 비율. 시험물질의 범주를 결정하는 시험법에 대한 정확도의 척도이며 시험법의 상관성을 평가하는데 중요한 고려사항임⁽¹³⁾

물질(Substance): 생산과정을 통해 얻어지거나 또는 자연 상태로 얻는 화학원소들(elements)과 이들로 이루어진 구성물질(compound). 생산품의 안정성을 유지시키는데 필요한 모든 첨가제와 생산과정에서 유래하는 불순물을 포함한다. 그러나 해당물질의 안정성이나 그 조성의 변화에 영향을 주지 않고 분리될 수 있는 용매는 제외함⁽¹⁾

계면활성제(Surfactant): 세척제로 알려진 물질로서 액체의 표면 장력을 낮추어 거품 생성 또는 고체가 통과할 수 있도록 한다. 습윤제로도 알려짐

시험물질(Test chemical): “시험물질”이란 용어는 시험되는 대상을 언급할 때 사용됨

단계적 시험전략(Tiered testing strategy): 시험물질에 대한 기존의 모든 정보를 순차적인 순서에 따라 검토하는 단계적인 시험전략. 다음 단계로 진행하기 전에 위험분류를 결정하기 위한 충분한 정보가 있는가를 각 단계별로 가중치를 두어 검토한다. 만약 시험물질의 자극가능성이 기존 자료를 근거로 평가될 수 있다면, 추가적인 시험이 필요하지 않다. 시험물질의 자극가능성이 기존 자료를 근거로 평가될 수 없다면, 명백한 분류가 이루어질 때까지 단계적인 동물 시험 절차를 수행함

하향식 접근방식(Top-down approach): 심한 안 손상을 유발할 것으로 추정되는 물질에 대한 단계적 접근법. 음성의 결과가 나오는 다른 물질(음성 반응)로부터 심한 안 손상을 유발하는 양성(양성 반응)의 결과가 나오는 물질을 구별하는 것으로 시작됨

UN의 화학물질의 분류 및 표시에 관한 국제조화시스템(United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, UN GHS): 물리적, 보건적, 환경적 위험성의 수준 및 표준화된 유형에 따른 물질(물질과 혼합물)의 분류체계로 픽토그램, 표시방법, 위해에 대한 사항, 사전주의 사항, 안정성 자료 기록지와 같은 해당 소통방식을 통해 물질의 유해 정보를 전달하고, 사람(고용주, 근로자, 운송자, 소비자, 응급처치자)과 환경을 보호하고자 제시된 체계⁽¹⁾

UN GHS Category 1: 심한 안 손상을 유발하는 물질

UN GHS Category 2: 안자극을 유발하는 물질

UN GHS No Category: UN GHS Category 1 또는 2 (2A 또는 2B)로 분류되지 않는 것으로 어느 분류에도 속하지 않는 물질

UVCB(Substances of unknown or variable composition, complex reaction products or biological materials): 조성이 알려져 있지 않거나 다양한 조성으로 이루어진 물질, 복잡한 반응 산물, 또는 생물학적 물질

표 3: UN GHS 분류* a, b, c

UN GHS 분류		
Category 1 심한 안 손상/비가역적 영향		○ 다음의 (a) 및/또는 (b)의 결과가 도출되는 물질 (a) 적어도 한 마리의 동물에서 강한 독성을 나타내고, 21일 이내에 완전히 회복되지 않는 경우 (b) 시험물질 주입하고 24, 48, 72 시간 후, 평가되는 평균 점수가 3마리 동물 중 적어도 2마리에서 (i) 혼탁도 ≥ 3 및/또는 (ii) 홍채염 > 1.5의 양성반응을 나타내는 경우
Category 2 안자극/가역적 영향	Category 2A	○ 다음의 결과가 도출되는 물질 - 시험물질 주입하고 24, 48, 72 시간 후, 평균 점수가 3마리 동물 중 적어도 2마리에서 (a) 혼탁도 ≥ 1 및/또는 (b) 홍채염 ≥ 1 및/또는 (c) 결막홍조 (conjunctival redness) ≥ 2 및/또는 (d) 결막부종 (conjunctival oedema) ≥ 2의 양성반응을 나타내고, 21일 이내에 이러한 양성반응이 완전히 회복되는 경우
	Category 2B	○ 다음의 결과가 도출되는 물질 - 시험물질 주입하고 24, 48, 72 시간 후, 평균 점수가 3마리 동물 중 적어도 2마리에서 (a) 혼탁도 ≥ 1 및/또는 (b) 홍채염 ≥ 1 및/또는 (c) 결막홍조(conjunctival redness) ≥ 2 및/또는 (d) 결막부종(conjunctival oedema) ≥ 2의 양성반응을 나타내고, 7일 이내에 이러한 양성반응이 완전히 회복되어 눈에 약한 자극으로 여겨질 경우

* UN GHS (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publication

^a Human data 사용은 3.3.2.2 (UN GHS, 2013), chapter 1.1의 1.1.2.5 및 chapter 1.3의 1.3.2.4.7에서 다름

^b 점수 기준은 OECD Test Guideline 405에서 기술됨

^c 4~6마리의 동물 실험 평가는 3.3.5.3 (UN GHS, 2013)에서 주어진 기준을 따름

OECD/OCDE

491

Adopted:
28 July 2015

OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS

Short Time Exposure *In Vitro* Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage

INTRODUCTION

1. The Short Time Exposure (STE) test method is an *in vitro* method that can be used under certain circumstances and with specific limitations for hazard classification and labeling of chemicals (substances and mixtures) that induce serious eye damage as well as those that do not require classification for either serious eye damage or eye irritation, as defined by the United Nations (UN) Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS) (1).

2. For many years, the eye hazard potential of chemicals has been evaluated primarily using an *in vivo* rabbit eye test (TG 405). It is generally accepted that, in the foreseeable future, no single *in vitro* alternative test will be able to fully replace the *in vivo* rabbit eye test to predict across the full range of serious eye damage/eye irritation responses for different chemical classes. However, strategic combinations of alternative test methods used in a (tiered) testing strategy may well be able to fully replace the rabbit eye test (2). The top-down approach is designed for the testing of chemicals that can be expected, based on existing information, to have a high irritancy potential or induce serious eye damage. Conversely, the bottom-up approach is designed for the testing of chemicals that can be expected, based on existing information, not to cause sufficient eye irritation to require a classification. While the STE test method is not considered to be a complete replacement for the *in vivo* rabbit eye test, it is suitable for use as part of a tiered testing strategy for regulatory classification and labeling, such as the top-down/bottom-up approach, to identify without further testing (i) chemicals inducing serious eye damage (UN GHS Category 1) and (ii) chemicals (excluding highly volatile substances and all solid chemicals other than surfactants) that do not require classification for eye irritation or serious eye damage (UN GHS No Category) (1) (2). However, a chemical that is neither predicted to cause serious eye damage (UN GHS Category 1) nor UN GHS No Category (does not induce either serious eye damage or eye irritation) by the STE test method would require additional testing to establish a definitive classification. Furthermore, the appropriate regulatory authorities should be consulted before using the STE in a bottom-up approach under classification schemes other than the UN GHS.

3. The purpose of this test guideline (TG) is to describe the procedures used to evaluate the eye hazard potential of a test chemical based on its ability to induce cytotoxicity in the Short Time Exposure Test method. The cytotoxic effect of chemicals on corneal epithelial cells is an important mode of action (MOA) leading to corneal epithelium damage and eye irritation. Cell viability in the STE test method is

assessed by the quantitative measurement, after extraction from cells, of blue formazan salt produced by the living cells by enzymatic conversion of the vital dye MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), also known as Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (3). The obtained cell viability is compared to the solvent control (relative viability) and used to estimate the potential eye hazard of the test chemical. A test chemical is classified as UN GHS Category 1 when both the 5% and 0.05% concentrations result in a cell viability smaller than or equal to ($\leq$) 70%. Conversely, a chemical is predicted as UN GHS No Category when both 5% and 0.05% concentrations result in a cell viability higher than ($>$) 70%.

4. The term “test chemical” is used in this Test Guideline to refer to what is tested and is not related to the applicability of the STE test method to the testing of substances and/or mixtures. Definitions are provided in [Annex I](#).

INITIAL CONSIDERATIONS AND LIMITATIONS

5. This Test Guideline is based on a protocol developed by Kao Corporation (4), which was the subject of two different validation studies: one by the Validation Committee of the Japanese Society for Alternative to Animal Experiments (JSAAE) (5) and another by the Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) (6). A peer review was conducted by NICEATM/ICCVAM based on the validation study reports and background review documents on the test method (7).

6. When used to identify chemicals (substances and mixtures) inducing serious eye damage (UN GHS Category 1 (1), data obtained with the STE test method on 125 chemicals (including both substances and mixtures), showed an overall accuracy of 83% (104/125), a false positive rate of 1% (1/86), and a false negative rate of 51% (20/39) as compared to the *in vivo* rabbit eye test (7). The false negative rate obtained is not critical in the present context, since all test chemicals that induce a cell viability of $\leq$ 70% at a 5% concentration and $>$ 70% at 0.05% concentration would be subsequently tested with other adequately validated *in vitro* test methods or, as a last option, in the *in vivo* rabbit eye test, depending on regulatory requirements and in accordance with the sequential testing strategy and weight-of-evidence approaches currently recommended (1) (8). Mainly mono-constituent substances were tested, although a limited amount of data also exist on the testing of mixtures. The test method is nevertheless technically applicable to the testing of multi-constituent substances and mixtures. However, before use of this Test Guideline on a mixture for generating data for an intended regulatory purpose, it should be considered whether, and if so why, it may provide adequate results for that purpose. Such considerations are not needed when there is a regulatory requirement for testing of the mixture. The STE test method showed no other specific shortcomings when used to identify test chemicals as UN GHS Category 1. Investigators could consider using this test method on test chemicals, whereby cell viability $\leq$ 70% at both 5% and 0.05% concentration should be accepted as indicative of a response inducing serious eye damage that should be classified as UN GHS Category 1 without further testing.

7. When used to identify chemicals (substances and mixtures) not requiring classification for eye irritation and serious eye damage (i.e. UN GHS No Category), data obtained with the STE test method on 130 chemicals (including both substances and mixtures), showed an overall accuracy of 85% (110/130), a false negative rate of 12% (9/73), and a false positive rate of 19% (11/57) as compared to the *in vivo* rabbit eye test (7). If highly volatile substances and solid substances other than surfactants are excluded from the dataset, the overall accuracy improves to 90% (92/102), the false negative rate to 2% (1/54), and the false positive to 19% (9/48) (7). As a consequence, the potential shortcomings of the STE test method when used to identify test chemicals not requiring classification for eye irritation and serious eye damage (UN GHS No Category) are a high false negative rate for i) highly volatile substances with a vapor pressure over 6 kPa and ii) Solid chemicals (substances and mixtures) other than surfactants and mixtures composed only of surfactants. Such chemicals are excluded from the applicability domain of the STE test method (7).

8. In addition to the chemicals mentioned in paragraphs 6 and 7, the STE test method generated dataset also contains in-house data on 40 mixtures, which when compared to the *in vivo* Draize eye test, showed an accuracy of 88% (35/40), a false positive rate of 50% (5/10), and a false negative rate of 0% (0/30) for predicting mixtures that do not require classification under the UN GHS classification system (9). The STE test method can therefore be applied to identify mixtures as UN GHS No Category in a bottom-up approach with the exception of solid mixtures other than those composed only of surfactants as an extension of its limitation to solid substances. Furthermore, mixtures containing substances with vapour pressure higher than 6kPa should be evaluated with care to avoid potential under-predictions, and should be justified on a case-by-case basis.

9. The STE test method cannot be used for the identification of test chemicals as UN GHS Category 2, Category 2A (eye irritation) or UN GHS Category 2B (mild eye irritation), due to the considerable number of UN GHS Category 1 chemicals under-predicted as UN GHS Category 2, 2A, or 2B and UN GHS No Category chemicals over-predicted as UN GHS Category 2, 2A, or 2B (7). For this purpose, further testing with another suitable method may be required.

10. The STE test method is suitable for test chemicals that are dissolved or uniformly suspended for at least 5 minutes in physiological saline, 5% dimethyl sulfoxide (DMSO) in saline, or mineral oil. The STE test method is not suitable for test chemicals that are insoluble or cannot be uniformly suspended for at least 5 minutes in physiological saline, 5% DMSO in saline, or mineral oil. The use of mineral oil in the STE test method is possible because of the short-time exposure. Therefore, the STE test method is suitable for predicting the eye hazard potential of water-insoluble test chemicals (*e.g.*, long-chain fatty alcohols or ketones) provided that they are miscible in at least one of the three above proposed solvents (4).

11. The term "test chemical" is used in this Test Guideline to refer to what is being tested¹¹ and is not related to the applicability of the STE test method to the testing of substances and/or mixtures.

PRINCIPLE OF THE TEST

11. The STE test method is a cytotoxicity-based *in vitro* assay that is performed on a confluent monolayer of Statens Seruminstitut Rabbit Cornea (SIRC) cells, cultured on a 96-well polycarbonate microplate (4). After five-minute exposure to a test chemical, the cytotoxicity is quantitatively measured as the relative viability of SIRC cells using the MTT assay (4). Decreased cell viability is used to predict potential adverse effects leading to ocular damage.

12. It has been reported that 80% of a solution dropped into the eye of a rabbit is excreted through the conjunctival sac within three to four minutes, while greater than 80% of a solution dropped into the human eye is excreted within one to two minutes (10). The STE test method attempts to approximate these exposure times and makes use of cytotoxicity as an endpoint to assess the extent of damage to SIRC cells following a five-minute exposure to the test chemical.

DEMONSTRATION OF PROFICIENCY

13. Prior to routine use of the STE test method described in this test guideline, laboratories should demonstrate technical proficiency by correctly classifying the eleven substances recommended in Table 1. These substances were selected to represent the full range of responses for serious eye damage or eye irritation based on results of *in vivo* rabbit eye tests (TG 405) and the UN GHS classification system (1). Other selection criteria included that the substances should be commercially available, that high-quality *in vivo* reference data should be available, and that high-quality *in vitro* data from the STE test method should

¹¹ In June 2013, the Joint Meeting agreed that where possible, a more consistent use of the term "test chemical" describing what is being tested should now be applied in new and updated Test Guidelines.

be available (3). In situations where a listed substance is unavailable or where justifiable, another substance for which adequate *in vivo* and *in vitro* reference data are available could be used provided that the same criteria as described here are used.

Table 1: List of Proficiency Substances

Substance	CASRN	Chemical class ¹	Physical state	<i>In Vivo</i> UN GHS Cat. ²	Solvent in STE test	STE UN GHS Cat.
Benzalkonium chloride (10%, aqueous)	8001-54-5	Onium compound	Liquid	Category 1	Saline	Category 1
Triton X-100 (100%)	9002-93-1	Ether	Liquid	Category 1	Saline	Category 1
Acid Red 92	18472-87-2	Heterocyclic compound; Bromine compound; Chlorine compound	Solid	Category 1	Saline	Category 1
Sodium hydroxide	1310-73-2	Alkali; Inorganic chemical	Solid	Category 1 ³	Saline	Category 1
Butyrolactone	96-48-0	Lactone; Heterocyclic compound	Liquid	Category 2A	Saline	No prediction can be made
1-Octanol	111-87-5	Alcohol	Liquid	Category 2A/B ⁴	Mineral Oil	No prediction can be made
Cyclopentanol	96-41-3	Alcohol; Hydrocarbon, cyclic	Liquid	Category 2A/B ⁵	Saline	No prediction can be made
2-Ethoxyethyl acetate	111-15-9	Alcohol; Ether	Liquid	No Category	Saline	No Category
Dodecane	112-40-3	Hydrocarbon, acyclic	Liquid	No Category	Mineral Oil	No Category
Methyl isobutyl ketone	108-10-1	Ketone	Liquid	No Category	Mineral Oil	No Category
n,n-Dimethylguanidine sulfate	598-65-2	Amidine; Sulfur compound	Solid	No Category	Saline	No Category

Abbreviations: CAS RN = Chemical Abstracts Service Registry Number

¹Chemical classes were assigned using information obtained from previous NICEATM publications and if not available, using the National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH®) (via ChemIDplus® [National Library of Medicine], available at <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>) and structure determinations made by NICEATM.

²Based on results from the *in vivo* rabbit eye test (OECD TG 405) and using the UN GHS (1).

³Classification as Cat.1 is based on skin corrosive potential of 100% sodium hydroxide (listed as a proficiency chemical with skin corrosive potential in OECD TG 435) and the criterion for UN GHS category 1 (1).

⁴Classification as 2A or 2B depends on the interpretation of the UN GHS criterion for distinguishing between these two categories, i.e., 2 out of 6 vs 4 out of 6 animals with effects at day 7 necessary to generate a Category 2A classification. The *in vivo* dataset included 2 studies with 3 animals each. In one study two out of three animals showed effects at day 7 warranting a Cat. 2A classification (11), whereas in the second study all endpoints in all three animals recovered to a score of zero by day 7 warranting a Cat. 2B classification (12).

⁵Classification as 2A or 2B depends on the interpretation of the UN GHS criterion for distinguishing between these

two categories, i.e., 1 out of 3 vs 2 out of 3 animals with effects at day 7 necessary to generate a Category 2A classification. The *in vivo* study included 3 animals. All endpoints apart from corneal opacity and conjunctivae redness in one animal recovered to a score of zero by day 7 or earlier. The one animal that did not fully recover by day 7 had a corneal opacity score of 1 and a conjunctivae redness of 1 (at day 7) that fully recovered at day 14 (11).

PROCEDURE

Preparation of the Cellular Monolayer

14. The rabbit cornea cell line, SIRC should be used for performing the STE test method. It is recommended that SIRC cells are obtained from a well-qualified cell bank, such as American Type Culture Collection CCL60.

15. SIRC cells are cultured at 37°C under 5% CO₂ and humidified atmosphere in a culture flask containing a culture medium comprising Eagle's minimum essential medium (MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 50–100 units/mL penicillin and 50–100 µg/mL streptomycin. Cells that have become confluent in the culture flask should be separated using trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid solution, with or without the use of a cell scraper. Cells are propagated (e.g. 2 to 3 passages) in a culture flask before being employed for routine testing, and should undergo no more than 25 passages from thawing.

16. Cells ready to be used for the STE test are then prepared at the appropriate density and seeded into 96-well plates. The recommended cell seeding density is 6.0×10^3 cells per well when cells are used four days after seeding, or 3.0×10^3 cells per well when cells are used five days after seeding, at a culture volume of 200 µL. Cells used for the STE test that are seeded in a culture medium at the appropriate density will reach a confluence of more than 80% at the time of testing, i.e., four or five days after seeding.

Application of the Test Chemicals and Control Substances

17. The first choice of solvent for dissolving or suspending test chemicals is physiological saline. If the test chemical demonstrates low solubility or cannot be dissolved or suspended uniformly for at least five minutes in saline, 5% DMSO (CAS#67-68-5) in saline is used as a second choice solvent. For test chemicals that cannot be dissolved or suspended uniformly for at least five minutes in either saline or 5% DMSO in saline, mineral oil (CAS#8042-47-5) is used as a third choice solvent.

18. Test chemicals are dissolved or suspended uniformly in the selected solvent at 5% (w/w) concentration and further diluted by serial 10-fold dilution to 0.5% and 0.05% concentration. Each test chemical is to be tested at both 5% and 0.05% concentrations. Cells cultured in the 96-well plate are exposed to 200 µL/well of either a 5% or a 0.05% concentration of the test chemical solution (or suspension), for five minutes at room temperature. Test chemicals (mono-constituent substances or multi-constituent substances or mixtures) are considered as neat substances and diluted or suspended according to the method, regardless of their purity.

19. The culture medium described in paragraph 15 is used as a medium control in each plate of each repetition. Furthermore, cells are to be exposed also to solvent control samples in each plate of each repetition. The solvents listed in paragraph 17 have been confirmed to have no adverse effects on the viability of SIRC cells.

20. In the STE test method, 0.01% Sodium lauryl sulfate (SLS) in saline is to be used as a positive control in each plate of each repetition. In order to calculate cell viability of the positive control, each plate of each repetition has to also include a saline solvent control.

21. A blank is necessary to determine compensation for optical density and should be performed on wells containing only phosphate buffered saline, but no calcium and magnesium (PBS-) or cells.
22. Each sample (test chemical at 5% and 0.05%, medium control, solvent control, and positive control) should be tested in triplicate in each repetition by exposing the cells to 200 µL of the appropriate test or control chemical for five minutes at room temperature.
23. Benchmark substances are useful for evaluating the ocular irritancy potential of unknown chemicals of a specific chemical or product class, or for evaluating the relative irritancy potential of an ocular irritant within a specific range of irritant responses.

Cell Viability Measurement

24. After exposure, cells are washed twice with 200 µL of PBS and 200 µL of MTT solution (0.5 mg MTT/mL of culture medium) is added. After a two-hour reaction time in an incubator (37°C, 5% CO₂), the MTT solution is decanted, MTT formazan is extracted by adding 200 µL of 0.04 N hydrochloric acid-isopropanol for 60 minutes in the dark at room temperature, and the absorbance of the MTT formazan solution is measured at 570 nm with a plate reader. Interference of test chemicals with the MTT assay (by colorants or direct MTT reducers) only occurs if significant amount of test chemical is retained in the test system following rinsing after exposure which is the case for 3D Reconstructed human cornea or Reconstructed human epidermis tissues but is not relevant for the 2D cell cultures used for the STE test method.

Interpretation of Results and Prediction Model

25. The optical density (OD) values obtained for each test chemical are then used to calculate cell viability relative to the solvent control, which is set at 100%. The relative cell viability is expressed as a percentage and obtained by dividing the OD of test chemical by the OD of the solvent control after subtracting the OD of blank from both values.

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{(\text{OD}_{570} \text{ of test chemical}) - (\text{OD}_{570} \text{ of blank})}{(\text{OD}_{570} \text{ of solvent control}) - (\text{OD}_{570} \text{ of blank})} \times 100$$

Similarly, the relative cell viability of each solvent control is expressed as a percentage and obtained by dividing the OD of each solvent control by the OD of the medium control after subtracting the OD of blank from both values.

26. Three independent repetitions, each containing three replicate wells (*i.e.*, n=9), should be performed. The arithmetic mean of the three wells for each test chemical and solvent control in each independent repetition is used to calculate the arithmetic mean of relative cell viability. The final arithmetic mean of the cell viability is calculated from the three independent repetitions.

27. The cell viability cut-off values for identifying test chemicals inducing serious eye damage (UN GHS Category 1) and test chemicals not requiring classification for eye irritation or serious eye damage (UN GHS No Category) are given hereafter.

Table 2: Prediction model of the STE test method

Cell viability		UN GHS Classification	Applicability
At 5%	At 0.05%		
> 70%	> 70%	No Category	Substances and mixtures, with the exception of: i) highly volatile substances with a vapor pressure over 6 kPa ¹ and ii) Solid chemicals (substances and mixtures) other than surfactants and mixtures composed only of surfactants
≤ 70%	> 70%	No prediction can be made	Not applicable
≤ 70%	≤ 70%	Category 1	Substances and mixtures ²

¹ Mixtures containing substances with vapour pressure higher than 6kPa should be evaluated with care to avoid potential under-predictions, and should be justified on a case-by-case basis.

² Based on results obtained mainly with mono-constituent substances, although a limited amount of data also exist on the testing of mixtures. The test method is nevertheless technically applicable to the testing of multi-constituent substances and mixtures. Before use of this Test Guideline on a mixture for generating data for an intended regulatory purpose, it should be considered whether, and if so why, it may provide adequate results for that purpose. Such considerations are not needed, when there is a regulatory requirement for testing of the mixture.

Acceptance Criteria

28. Test results are judged to be acceptable when the following criteria are all satisfied:

- Optical density of the medium control (exposed to culture medium) should be 0.3 or higher after subtraction of blank optical density.
- Viability of the solvent control should be 80% or higher relative to the medium control. If multiple solvent controls are used in each repetition, each of those controls should show cell viability greater than 80% to qualify the test chemicals tested with those solvents.
- The cell viability obtained with the positive control (0.01% SLS) should be within two standard deviations of the historical mean. The upper and lower acceptance boundaries for the positive control should be frequently updated i.e., every three months, or each time an acceptable test is conducted in laboratories where tests are conducted infrequently (i.e., less than once a month). Where a laboratory does not complete a sufficient number of experiments to establish a statistically robust positive control distribution, it is acceptable that the upper and lower acceptance boundaries established by the method developer are used, i.e., between 21.1% and 62.3% according to its laboratory historical data, while an internal distribution is built during the first routine tests.
- Standard deviation of the final cell viability derived from three independent repetitions should be less than 15% for both 5% and 0.05% concentrations of the test chemical.

If one or several of these criteria is not met, the results should be discarded and another three independent repetitions should be conducted.

DATA AND REPORTING

Data

29. Data for each individual well (e.g., cell viability values) of each repetition as well as overall mean, SD, and classification are to be reported.

Test Report

30. The test report should include the following information:

Test Chemical and Control Substances

- Mono-constituent substance : chemical identification, such as IUPAC or CAS name(s), CAS registry number(s), SMILES or InChI code, structural formula, and/or other identifiers;
- Multi-constituent substance, UVCB and mixture: Characterization as far as possible by e.g., chemical identity (see above), purity, quantitative occurrence and relevant physicochemical properties (see above) of the constituents, to the extent available;
- Physical state, volatility, pH, LogP, molecular weight, chemical class, and additional relevant physicochemical properties relevant to the conduct of the study, to the extent available;
- Purity, chemical identity of impurities as appropriate and practically feasible, etc;
- Treatment prior to testing, if applicable (e.g., warming, grinding);
- Storage conditions and stability to the extent available.

Test Method Conditions and Procedures

- Name and address of the sponsor, test facility and study director;
- Description of the test method used;
- Cell line used, its source, passage number and confluence of cells used for testing;
- Details of test procedure used;
- Number of repetitions and replicates used;
- Test chemical concentrations used (if different than the ones recommended);
- Justification for choice of solvent for each test chemical;
- Duration of exposure to the test chemical (if different than the one recommended);
- Description of any modifications of the test procedure;

- Description of evaluation and decision criteria used;
- Reference to historical positive control mean and Standard Deviation (SD);
- Demonstration of proficiency of the laboratory in performing the test method (e.g. by testing of proficiency substances) or demonstration of reproducible performance of the test method over time.

Results

- For each test chemical and control substance, and each tested concentration, tabulation should be given for the individual OD values per replicate well, the arithmetic mean OD values for each independent repetition, the % cell viability for each independent repetition, and the final arithmetic mean % cell viability and SD over the three repetitions;
- Results for the medium, solvent and positive control demonstrating suitable study acceptance criteria;
- Description of other effects observed;
- The overall derived classification with reference to the prediction model/decision criteria used.

Discussion of the Results***Conclusions***

LITERATURE

- 1) United Nations UN (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Available at: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html].
- 2) Scott L, et al. (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9.
- 3) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to 7 Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
- 4) Takahashi Y, et al. (2008). Development of the Short Time Exposure (STE) Test: an *In Vitro* Eye Irritation Test Using SIRC Cells. *Toxicol. In Vitro* 22,760-770.
- 5) Sakaguchi H, et al. (2011). Validation Study of the Short Time Exposure (STE) Test to Assess the Eye Irritation Potential of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 25,796-809.
- 6) Kojima H, et al. (2013). Second-Phase Validation of Short Time Exposure Tests for Assessment of Eye Irritation Potency of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 27, pp.1855-1869.
- 7) ICCVAM (2013). Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document, NIH. Available at: [http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf].
- 8) OECD (2012). Test Guideline for Testing of Chemicals (No.405): Acute Eye Irritation/Corrosion.Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 9) Saito K, et al. (2015). Predictive Performance of the Short Time Exposure Test for Identifying Eye Irritation Potential of Chemical Mixtures.
- 10) Mikkelsen TJ, Chrai SS and Robinson JR. (1973). Altered Bioavailability of Drugs in the Eye Due to Drug-Protein Interaction. *J. Pharm. Sci.*1648-1653.
- 11) ECETOC. (1998). Eye Irritation Reference Chemicals Data Bank. Technical Report (No. 48. (2)), Brussels, Belgium.
- 12) Gautheron P, et al. (1992). Bovine Corneal Opacity and Permeability Test: an *In Vitro* Assay of Ocular Irritancy. *Fundam Appl Toxicol.* 18, 442-449.
- 13) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 34.). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

DEFINITIONS

Accuracy: The closeness of agreement between test method results and accepted reference values. It is a measure of test method performance and one aspect of relevance. The term is often used interchangeably with concordance to mean the proportion of correct outcomes of a test method (13).

Benchmark substance: A substance used as a standard for comparison to a test chemical. A benchmark substance should have the following properties; (i) a consistent and reliable source(s); (ii) structural and functional similarity to the class of substances being tested; (iii) known physical/chemical characteristics; (iv) supporting data on known effects, and (v) known potency in the range of the desired response.

Bottom-Up Approach: A step-wise approach used for a test chemical suspected of not requiring classification for eye irritation or serious eye damage, which starts with the determination of chemicals not requiring classification (negative outcome) from other chemicals (positive outcome)

Chemical: means a substance or mixture.

Eye irritation: Production of change in the eye following the application of a test chemical to the anterior surface of the eye, which are fully reversible within 21 days of application. Interchangeable with “reversible effects on the eye” and with UN GHS Category 2 (1)

False negative rate: The proportion of all positive chemicals falsely identified by a test method as negative. It is one indicator of test method performance.

False positive rate: The proportion of all negative chemicals that are falsely identified by a test method as positive. It is one indicator of test method performance.

Hazard: Inherent property of an agent or situation having the potential to cause adverse effects when an organism, system or (sub) population is exposed to that agent.

Medium control: An untreated replicate containing all components of a test system. This sample is processed with test chemical-treated samples and other control samples to determine whether the solvent interacts with the test system.

Mixture: A mixture or a solution composed of two or more substances in which they do not react (1).

Mono-constituent substance: A substance, defined by its quantitative composition, in which one main constituent is present to at least 80% (w/w).

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

Multi-constituent substance: A substance, defined by its quantitative composition, in which more than one main constituent is present in a concentration $\geq 10\%$ (w/w) and $< 80\%$ (w/w). A multi-constituent substance is the result of a manufacturing process. The difference between mixture and multi-constituent substance is that a mixture is obtained by blending of two or more substances without chemical reaction. A multi-constituent substance is the result of a chemical reaction.

OD: Optical Density.

Positive control: A replicate containing all components of a test system and treated with a substance known to induce a positive response. To ensure that variability in the positive control response across time can be assessed, the magnitude of the positive response should not be excessive.

Relevance: Description of relationship of the test to the effect of interest and whether it is meaningful and useful for a particular purpose. It is the extent to which the test correctly measures or predicts the biological effect of interest. Relevance incorporates consideration of the accuracy (concordance) of a test method (10).

Reliability: Measures of the extent that a test method can be performed reproducibly within and between laboratories over time, when performed using the same protocol. It is assessed by calculating intra- and inter-laboratory reproducibility and intra-laboratory repeatability (13).

Sensitivity: The proportion of all positive/active chemicals that are correctly classified by the test. It is a measure of accuracy for a test method that produces categorical results, and is an important consideration in assessing the relevance of a test method (10).

Serious eye damage: Production of tissue damage in the eye, or serious physical decay of vision, following application of a test chemical to the anterior surface of the eye, which is not fully reversible within 21 days of application. Interchangeable with “irreversible effects on the eye” and with UN GHS Category 1 (1).

Solvent/vehicle control: An untreated sample containing all components of a test system, including the solvent or vehicle that is processed with the test chemical-treated and other control samples to establish the baseline response for the samples treated with the test chemical dissolved in the same solvent or vehicle. When tested with a concurrent medium control, this sample also demonstrates whether the solvent or vehicle interacts with the test system.

Specificity: The proportion of all negative/inactive chemicals that are correctly classified by the test. It is a measure of accuracy for a test method that produces categorical results and is an important consideration in assessing the relevance of a test method (13).

Substance: Chemical elements and their compounds in the natural state or obtained by any production process, inducing any additive necessary to preserve the stability of the product and any impurities deriving from the process used, but excluding any solvent which may be separated without affecting the stability of the substance or changing its composition (1).

Surfactant: Also called surface-active agent, this is a chemical such as a detergent, that can reduce the surface tension of a liquid and thus allow it to foam or penetrate solids; it is also known as a wetting agent.

Test chemical: The term “test chemical” is used to refer to what is being tested.

Tiered testing strategy: A stepwise testing strategy where all existing information on a test chemical is reviewed, in a specified order, using a weight of evidence process at each tier to determine if sufficient information is available for a hazard classification decision, prior to progression to the next tier. If the irritancy potential of a test chemical can be assigned based on the existing information, no additional testing is required. If the irritancy potential of a test chemical cannot be assigned based on the existing information, a step-wise sequential animal testing procedure is performed until an unequivocal classification can be made.

Top-Down Approach: step-wise approach used for a test chemical suspected of causing serious eye damage, which starts with the determination of chemicals inducing serious eye damage (positive outcome) from other chemicals (negative outcome).

United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (UN GHS): A system proposing the classification of chemicals (substances and mixtures) according to standardized types and levels of physical, health and environmental hazards, and addressing corresponding communication elements, such as pictograms, signal words, hazard statements, precautionary statements and safety data sheets, so that to convey information on their adverse effects with a view to protect people (including employers, workers, transporters, consumers and emergency responders) and the environment (1).

UN GHS Category 1: See “Serious eye damage”.

UN GHS Category 2: See “Eye irritation”.

UN GHS No Category: Chemicals that are not classified as UN GHS Category 1 or 2 (2A or 2B).

UVCB: substances of unknown or variable composition, complex reaction products or biological materials.

“화장품 안자극 동물대체시험법 (단시간 노출법, STE)
가이드라인 (민원인 안내서)”

발 행 일 2017 년 9 월

발 행 인 식품의약품안전평가원장 이선희

편집위원장 독성평가연구부장 박혜경

편 집 위 원 이종권, 김태성, 김주환, 이정선, 고경육, 안일영, 김지영
최보경, 이정표

도움주신분 김배환, 송유석, 안수선, 임경민, 정미숙

문 의 처 식품의약품안전평가원, 특수독성과

Tel : 043-719-5152, 5155 Fax : 043-719-5150

주 소 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명 2로 187,
오송보건의료행정타운 식품의약품안전처 식품의약품안전평가원
