

등록번호

안내서-0749-01

화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인 (II) (민원인 안내서)

- 단회투여독성시험법 -

고정 용량 방법(Fixed Dose Procedure)

급성 독성 클래스 방법(Acute Toxic Class Method)

2008. 11.



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

독성평가연구부 특수독성과

지침서·안내서 제·개정 점검표

명칭

화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인(Ⅱ) (민원인 안내서)

아래에 해당하는 사항에 체크하여 주시기 바랍니다.

등록대상 여부	<input type="checkbox"/> 이미 등록된 지침서·안내서 중 동일·유사한 내용의 지침서·안내서가 있습니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 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 : _____)	
	<input type="checkbox"/> 법령(법·시행령·시행규칙) 또는 행정규칙(고시·훈령·예규)의 내용을 단순 편집 또는 나열한 것입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 단순한 사실을 대외적으로 알리는 공고의 내용입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 1년 이내 한시적 적용 또는 일회성 지시·명령에 해당하는 내용입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 외국 규정을 번역하거나 설명하는 내용입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 신규 직원 교육을 위해 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 정리한 자료입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 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	<input type="checkbox"/> 내부적으로 행정사무의 통일을 기하기 위하여 반복적으로 행정사무의 세부기준이나 절차를 제시하는 것입니까? (공무원용)	<input type="checkbox"/> 예(☞ 지침서) <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 대내외적으로 법령 또는 고시·훈령·예규 등을 알기 쉽게 풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전처의 입장을 기술하는 것입니까? (민원인용)	<input checked="" type="checkbox"/> 예(☞ 안내서) <input type="checkbox"/> 아니오
기타 확인 사항	<input type="checkbox"/> 상위 법령을 일탈하여 새로운 규제를 신설·강화하거나 민원인을 구속하는 내용이 있습니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	☞ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 상위법령 일탈 내용을 삭제하시고 지침서·안내서 제·개정 절차를 진행하시기 바랍니다.	
상기 사항에 대하여 확인하였음.		
2017년 5월 31일		
담당자 확 인(부서장)		고 경 육 이 종 권

이 안내서는 화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인(II)에 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 2008년 11월 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

팩스번호: 043-719-5150

제·개정 이력

연번	제·개정번호	승인일자	주요내용
1	B1-2008-4-002	2008.11.	화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인(II) 제정
2	안내서-0749-01	-	「식약처 지침서등의 관리에 관한 규정」 개정에 따른 일괄 재분류 (규제개혁담당관실-3761호,2017.5.16)

발 간 사

화장품은 사람들에게 아름다움과 풍요로움을 주는 제품으로서 일상 생활에서 필수적인 제품으로 자리 잡고 있으며, 화장품의 종류와 사용법이 날로 새로워지고 있습니다. 또한 세계적인 웰빙 열풍에 따라 기능성화장품, 천연유래 화장품의 개발이 급증하고 있으며, 이와 더불어 새로운 화장품원료의 개발도 증가하고 있는 추세입니다.

화장품은 매일 수차례, 평생을 통하여 사용하는 제품이므로 안전성에 대한 확보는 아무리 강조해도 지나치지 않을 것입니다. 화장품의 안전성을 확보하기 위한 일환으로 우리청에서는 단회투여독성시험, 1차 피부자극 시험법 등의 독성시험방법을 고시하고 있습니다.

인류의 건강을 위하여 수행되고 있는 독성시험방법들은 다수의 실험동물을 희생시키고 있으므로, 동물보호 운동과 더불어 실험동물의 희생을 최소화 하도록 노력하는 것이 세계적인 추세로 자리 잡고 있습니다. 이에 따라 실험동물을 사용하지 않거나(replacement), 동물의 수를 줄이거나(reduction), 고통을 완화하는(refinement) 방법으로 대체시험법들이 개발되고 있습니다.

이러한 추세에 발맞추기 위하여 우리청에서는 2007년 11월 In vitro 3T3 NRU 광독성시험법, 피부감작성 시험법에 대한 대체시험방법 가이드라인을 제정한 바 있습니다. 금번에는 단회투여 독성 시험법에 대한 대체시험방법 가이드라인을 제정하게 되었으며, 앞으로도 지속적으로 동물대체시험법 연구와 가이드라인 제정에 힘 쓸 것입니다. 우리청은 이 가이드라인이 실험동물 보호라는 기본적인 목적과 더불어 국내 화장품 관련 업계 및 학계에 화장품의 안전성 연구 활성화에 기여할 것으로 기대하고 있습니다. 화장품 안전성확보와 실험동물의 보호라는 두 마리 토끼를 잡기위한 이러한 노력이 결실을 맺기 위해서는 정부뿐만 아니라 관련 산·학·연에서도 동시에 노력을 기울여야 할 것입니다.

마지막으로 동물대체시험법 연구와 이 가이드라인 제정을 위하여 힘써주신 식약청 화장품평가팀 직원들의 노고를 치하하며 아무쪼록 이 가이드라인이 화장품의 안전성확보에 기여하길 기대합니다.

2008년 11월

식품의약품안전청장

서론

1. 배경

- 가. 화장품 안전성 평가에 있어 국제적으로 동물대체시험법의 요구가 높아지고 있으며, 유럽에서는 화장품 안전성 평가 시 실험동물 이용을 금지시키는 법안이 통과됨
- 나. 화장품산업이 급속하게 과학화, 국제화가 추진되고 있어 화장품에 대한 과학적이고 효율적인 안전성 평가방법의 가이드라인이 요구됨
- 다. 이에 따라 화장품의 안전성 평가 시 국제적으로 대두되고 있는 동물대체시험법을 고려하여 동물대체시험법에 대한 가이드라인을 제정하고자 함

2. 목적

- 가. 국제적 추세에 맞는 과학적이고 객관적인 동물대체시험법을 제시함으로써 화장품 안전성 평가에 기여하고,
- 나. 표준화된 동물대체시험법 가이드라인의 제시로 화장품업계 및 독성시험 연구기관의 국제 경쟁력을 향상시키고자 함

I. 고정 용량 방법 (Fixed Dose Procedure)

1. 개요

가. 단회투여 독성을 평가하는 종래의 방법은 동물 사망을 시험 종료시점으로 한다. 1984년 BTS(British Toxicology Society)는 고정용량투여를 기반으로 하는 단회투여독성시험을 제안했다⁽¹⁾. 이 방식은 시험 종료시점을 동물 사망여부로 하는 대신 고정용량 중 한 용량으로 투여 시 명확한 독성징후가 나타나는지 여부로 한 것이다. 영국⁽²⁾ 및 국제적⁽³⁾ 체내(in vivo) 밸리데이션 연구에 근거하여, 위원회는 1992년에 이 시험방법을 시험 가이드라인으로 채택했다. 이후 일련의 연구를 거쳐 수학적 모델을 이용한 일련의 연구에서 고정 용량 방법의 통계학적 특징이 평가되었다⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾. 체내(in vivo) 실험과 모델링 연구를 통해, 이 시험법이 재현성이 있으며 종래의 시험방법보다 적은 동물을 사용하고 고통을 덜 유발하며, 다른 급성 독성 시험방법과 유사한 방식으로 성분의 등급을 정할 수 있는 것으로 밝혀졌다.

나. 이 가이드라인에서 사용하는 용어의 정의는 별첨 1과 같다.

2. 초기 검토사항

가. 본 시험에서는 중등 규모의 독성 용량만을 사용하며, 치사 수준의 용량 투여는 피해야 한다는 것이 이 방법의 원칙이다. 또한 부식성 또는 심각한 자극성 때문에 명확히 통증과 고통을 유발하는 것으로 알려진 용량은 투여할 필요가 없다. 사망 직전의 동물이나 뚜렷한 통증 상태 또는 중증의 지속적 고통 징후를 보이는 동물은 인도적으로 안락사 시키고, 시험 도중에 죽은 동물과 동일한 방식으로 시험 결과의 해석 시에 검토한다.

나. 이 방법은 위해 특징에 관한 정보를 제공하며, 급성 독성을 유발하는 화학물질의 분류에 관한 시스템(GHS)에 의거하여 그 결과를 바탕으로 특정 성분의 등급을 정하고 분류할 수 있다⁽⁸⁾.

다. 시험 시작에 앞서 시험 물질에 관한 모든 가용 정보를 검토한다. 시험 성분의 기본 정보와 화학적 구조, 그의 물리적/화학적 특징, 다른 체외 또는 체내 독성 시험 결과, 구조적 연관성이 있는 성분의 독성 데이터,

그리고 그 성분의 예상 용도 등에 관한 정보가 이에 해당된다. 이런 정보는 사람 건강 보호와 이 시험의 연관성을 결정하는데 유용하며, 적절한 시작 용량을 선정하는데 도움이 될 수 있다.

3. 시험법의 원리

가. 5, 50, 300, 2000 mg/kg의 고정 용량을 단계별로 단일 성별의 동물 그룹에 투여한다(예외적으로 5000 mg/kg의 추가적인 고정 용량을 고려할 수 있다.(5. 시험절차 나. 예비실험의 4)항 참조). 심각한 독성 영향이나 사망을 유발하지 않고 일부 독성 징후를 발생시킬 것으로 예상되는 용량으로 실시한 연구 결과에 근거하여, 초기 용량을 선정한다. 독성 징후나 사망의 유무에 따라 더 높거나 낮은 고정 용량을 추가 동물 그룹에게 투여할 수 있다. 명백한 독성을 유발하는 용량이나 한 마리 이상의 사망을 유발하지 않는 용량이 확인될 때까지, 또는 최고 용량에서 아무런 영향이 관찰되지 않거나 최저 용량에서 사망이 발생할 때까지, 이 절차를 계속한다.

4. 시험준비

가. 동물종의 선정

- 1) 다른 설치류를 사용할 수도 있지만, 가장 바람직한 것은 랫트이다. 일반적으로 암컷 랫트를 사용한다⁽⁷⁾. 기존 LD₅₀ 시험에 관한 문헌을 조사한 결과, 일반적으로 성별 사이의 감수성 차이가 별로 없으며, 차이가 있더라도 암컷이 약간 더 민감한 것으로 나타났기 때문이다.⁽⁹⁾ 하지만 구조와 연관된 독성 또는 독성동태학적 특징을 알고 있으며 이에 따르면 수컷이 더 민감한 경우에는 수컷을 사용한다. 수컷을 상대로 시험을 실시한다면, 그 타당성을 제시해야 한다.
- 2) 일반적으로 실험실에서 사용하는 건강하고 젊은 성체 동물종을 사용한다. 암컷은 새끼를 낳은 적이 없고 새끼를 배지 않은 상태여야 한다. 투여 시작 시점의 동물 연령은 8주에서 12주 사이여야 하며, 몸무게는 앞서 투여한 동물의 체중 평균 대비 $\pm 20\%$ 구간에 속해야 한다.

나. 사육 및 식이조건

- 1) 실험동물 사육실의 온도는 $22^{\circ}\text{C}(\pm 3^{\circ}\text{C})$ 여야 한다. 상대 습도는 최소한 30%로 하고 실내 청소 기간 이외에는 70%를 넘지 않도록 하는 것이 바람직하나, 50-60%를 목표로 한다. 인공 조명을 사용하며, 12시간 간격으로 주야를 정한다. 일반적인 설치류 사료를 사용하며 물은 무제한 공급한다. 동물을 용량별로 그룹을 지어 케이지에 넣지만, 케이지별 동물의 수는 각 동물을 명확히 관찰하는데 방해가 되지 않아야 한다.

다. 동물 준비

- 1) 시험 조건에 순응할 수 있도록, 적어도 투여 5일 전에 동물을 무작위로 선정하고 개별적으로 식별 표시를 하며 각자의 케이지에 넣는다.

라. 시료 준비

- 1) 일반적으로 시험 물질은 농도를 달리하여 시험할 용량 범위로 일정량을 만들어 투여한다. 액상 물질이나 혼합물을 시험한다면, 일정 농도의 미희석 시험 물질을 사용하는 것이 그 성분의 위해 평가와 보다 관련성이 있을 것이며, 어떤 경우이건 최대 투여 용량을 넘지 않도록 한다. 한번에 투여할 수 있는 최대 액량은 실험동물의 크기에 따라 다르다. 설치류의 경우에는 체중 100 g 당 1 ml을 넘지 않아야 한다. 하지만 수용액인 경우에는 2 ml/100 g 까지도 고려할 수 있다. 투여 시료를 조제할 때, 가능하면 액상/현탁액/유제의 사용이 권고되는데, 바람직하게는 액상/현탁액/유제(예, 옥수수유) 순서로 하고, 다른 용매를 사용한 용액을 사용할 수 있다. 물 이외의 다른 용매를 사용하는 경우에는 그의 독성학적 특성을 알아야 한다. 사용 기간까지의 안정성이 확보되지 않았다면, 투여 직전에 조제한다.

5. 시험절차

가. 투여

- 1) 시험물질은 위관이나 적합한 삼관 캐놀라를 사용하여 경구투여 (gavage) 방식으로 단일 용량을 투여한다. 또한, 한번에 투여하는 것이 곤란한 시험물질에 대해서는 24시간 이내에 분할 투여할 수도 있다. 다만, 분할하여 투여한 경우는 그 이유를 명확히 하는 것이 필요하다.
- 2) 투여에 앞서 동물을 금식시킨다(예, 랫트의 경우에는 밤새 사료를 주지 않고(물은 제외), 마우스인 경우에는 사료를 3-4시간 동안 주지 않는다(물은 제외). 금식 기간이 지난 다음에 체중을 재고 시험 성분을 투여한다. 성분 투여 이후에는 랫트의 경우에 3-4시간, 마우스는 1-2시간 동안 추가로 사료를 주지 않을 수 있다. 일정 기간 동안 나누어 투여하는 경우에는, 기간에 따라 사료와 물을 동물에게 공급할 필요가 있을 수 있다.

나. 예비 시험

- 1) 예비 시험의 목적은 본 시험의 적정 시작 용량을 선택하는데 있다. 사료를 별첨 2의 흐름도에 따라 순차적으로 동물에 투여한다. 본 실험을 위한 시작 용량을 결정할 수 있을 때(또는 최저 고정 용량에서 사망이 관찰된 경우), 예비 실험을 완료한다.
- 2) 예비 시험의 시작 용량은 동일 화학물질과 구조적으로 연관성이 있는 화학물질의 체내 및 체외 실험 데이터를 근거로, 명백한 독성을 유발할 것으로 예상되는 용량으로써, 5, 50, 300, 2000 mg/kg의 고정 용량 중에서 선택한다. 이런 정보가 없을 때는 시작 용량을 300 mg/kg으로 한다.
- 3) 각 동물의 투여 간격을 최소 24시간으로 한다. 모든 동물을 최소 14일간 관찰한다.
- 4) 예외적으로, 그리고 규제 필요성 때문에 타당성이 있는 경우에만, 추가적으로 5000 mg/kg의 고정 용량을 고려할 수 있다(별첨 4 참조). 동물 복지 차원에서 GHS 카테고리 5 범위(2000 - 5000 mg/kg)에서 시험을 실시하는 것은 권장되지 않으며, 시험 결과가 사람이나 동물의 건강

또는 환경 보호 측면과 직접적인 연관성을 가질 가능성이 높은 경우에만 이 방법을 검토한다.

- 5) 예비 시험에서 최저 고정 용량 (5 mg/kg)을 투여 받은 동물이 죽으면, 예비 시험을 중단하고 이 성분을 GHS 카테고리 1로 분류한다(별첨 2 참조). 하지만 이 분류를 추가로 확인할 필요가 있으면, 선택적인 보완 시험을 다음과 같이 실시할 수 있다. 두 번째 동물에 5 mg/kg을 투여한다. 이 두 번째 동물이 죽으면, GHS 카테고리 1이 확인되는 것이며, 이 시험은 즉시 종료한다. 두 번째 동물이 생존하면 최대 3마리에게 5 mg/kg을 추가로 투여한다. 사망 위험성이 높기 때문에, 이들 동물은 동물 복지 차원에서 순차적으로 투여한다. 각 동물의 투여 사이 간격은 이전 동물이 생존할 가능성이 있다고 판단하기에 충분해야 한다. 두 번째 동물이 죽으면, 투여를 즉시 중단한다. 두 번째 동물의 사망(종료 당시에 시험한 동물의 수와 관계없이)은 A 결과에 해당되므로(2마리 이상의 사망), 별첨 3의 5 mg/kg 고정 용량에서의 분류 규칙을 따른다. (2마리 이상이 죽으면 카테고리 1, 1마리 이상 죽지 않으면 카테고리 2)

다. 본 실험

1) 동물의 수와 용량

가) 시작 용량에서 시험 이후에 취할 조치 사항이 별첨 3에 화살표로 표시되어 있다. 3개 조치 가운데 하나가 요구된다. 실험을 중지하고 적절한 위해 분류 클래스를 부여하거나, 더 높은 고정 용량에서 시험을 하거나, 더 낮은 고정 용량에서 시험한다. 하지만 동물 보호를 위하여 예비 시험에서 사망을 유발한 용량은 본 실험에서 다시 실험하지 않는다(별첨 3 참조). 경험에 의하면, 시작 용량에서 그 성분을 분류하고 추가 시험이 필요하지 않을 가능성이 높다.

나) 한 성별의 총 5마리를 조사 대상 용량별로 사용한다. 5마리는 예비 시험에서 선택한 용량을 투여 받은 1마리와 추가 4마리로 구성한다(본 시험의 용량이 예비 시험에 포함되지 않은 경우는 예외).

다) 각 용량에서 투여 시간 간격은 독성 징후의 발생, 지속 기간, 심각성에 따라 결정한다. 이전 투여 동물의 생존을 확신할 때까지, 다음 단계 용량의 동물 투여를 연기한다. 필요한 경우에는 자연 독성 관찰을 위해, 각 용량에서 투여 사이에 3일 또는 4일의 간격을 두는 것이 좋다. 반응이 확정적이지 않은 경우 등, 필요할 때는 간격을 조정할 수 있다.

라) 5000 mg/kg의 상한 고정 용량을 검토할 때는, 별첨 4에 제시된 절차를 따른다. (5. 시험절차 나. 예비시험의 4)항 참조).

2) 한도 시험

가) 한도 시험은 해당 시험 물질이 비독성일 가능성이 있다는 정보, 즉 규제 한도 용량 이상에서만 독성을 나타낸다는 증거가 있는 경우에 적용한다. 시험 물질의 독성 정보는 독성학적 의미가 있는 것으로 알려진 성분과 그의 비율을 고려하여, 유사한 화합물이나 혼합물 또는 제품의 시험 결과에서 확보할 수 있다. 독성 정보가 거의 없거나 시험 물질이 독성을 가질 것으로 예상되는 경우에는 본 시험을 실시한다.

나) 2000 mg/kg(또는 예외적으로 5000 mg/kg) 용량 수준에서 예비 시험을 실시하고, 이 수준의 용량을 추가로 4마리에 투여한다.

3) 관찰

가) 투여 동물을 개별적으로 관찰하며, 투여 이후 30분 동안 최소 1회 관찰하고 이후 첫 24시간 동안 주기적으로 관찰하며(특히 첫 4시간 동안 주의하여 관찰), 이후에는 동물 복지 차원에서 안락사 시켰거나, 시험에서 제외된 동물을 제외하고는 14일 동안 매일 관찰한다. 하지만 관찰 기간을 엄격하게 고정시킬 필요는 없다. 독성 반응과 시험 시작시기, 그리고 회복 기간을 감안해 결정하며 필요한 경우에는 늘어날 수도 있다. 독성 징후가 나타나고 사라지는 시기가 중요하다. 독성 징후가 지연되어 나타나는 경향이 있을 때 특히 그렇다 (10). 모든 관찰 내용을 동물별 기록서에 체계적으로 기록한다.

나) 동물이 계속 독성 징후를 보이면, 추가 관찰이 필요하다. 이때 피부와 털, 눈, 점막, 그리고 호흡기, 자율신경계와 중추신경계, 그리고 체성운동 활동과 행동 패턴의 변화를 관찰한다. 진전, 경련, 타액 분비, 설사, 무기력, 수면, 혼수상태의 관찰에 주의를 기울인다. 사망 직전 상태인 동물과 심각한 통증이나 심각한 고통 징후를 보이는 동물은 인도적으로 안락사 시킨다. 동물을 인도적으로 안락사 시키거나 동물이 죽은 상태로 발견되면, 사망 시점을 최대한 정확하게 기록한다.

4) 체중

가) 시료를 투여하기 직전, 투여 후에는 적어도 매주 동물의 체중을 잰다. 체중 변화를 계산하고 기록한다. 체중 측정의 빈도는 그 추이를 알도록 하는 것이 원칙이므로 모든 예에 획일적으로 규정할 필요는 없다. 시험 종료 시에 생존 동물의 체중을 재고 인도적으로 안락사 시킨다.

5) 병리

가) 시험한 모든 동물(시험 도중에 죽은 동물이나 동물 복지 차원에서 시험 도중에 안락사 시킨 동물 포함)을 부검한다. 동물별로 모든 병리학적 변화를 기록한다. 24시간 이상 생존한 동물에서 병리학적 징후를 보인 장기는 현미경으로 검사한다. 유용한 정보를 얻을 수 있기 때문이다.

라. 데이터

1) 동물별로 데이터를 제시한다. 또한 모든 데이터를 도표 형식으로 정리하여, 시험 그룹별로 전체 동물의 수, 독성 징후를 보인 동물의 수, 시험 도중에 죽은 동물이나 인도적으로 안락사 시킨 동물의 수, 동물별 사망 시점, 독성 영향에 대한 설명과 경과, 그리고 회복성, 부검 결과를 기술한다.

6. 결과 보고

가. 시험보고서에는 다음과 같은 정보를 포함하여야 한다.

1) 시험 물질

- 물리적 특성, 순도, 그리고 관련성이 있는 경우에는 이화학적 특징 (이성질체 포함)
- 기본 식별 정보(CAS 번호 포함)

2) 용매

- 물 이외의 용매를 사용하는 경우에는 그 용매 선택의 이유

3) 실험동물

- 종/계통
- 알고 있는 경우에는 동물의 미생물학적 상태
- 동물의 수, 연령, 성별(암컷 대신에 수컷을 사용한 경우 그 이유)
- 출처, 사육 조건, 사료 등

4) 시험조건

- 시험 물질의 물리적 상태에 대한 설명, 시험 물질의 조성에 대한 설명
- 투여량과 투여시기를 포함하여 시험 물질의 투여에 관한 정보
- 사료와 물의 품질(사료 종류/출처, 물의 출처 포함)
- 시작 용량 선정 근거

5) 결과

- 동물별 반응 데이터와 용량 수준의 도표화(즉, 사망을 포함하여 독성 징후를 보인 동물과 독성 징후의 특성, 심각도, 지속 기간)
- 체중과 체중 변화
- 투여 당일의 동물 체중과 이후 주간 간격과 사망 또는 인도적 안락사 당시의 체중
- 시험 도중 사망한 경우에는 그 일시
- 독성 징후 발현 시간과 동물별로 독성 징후의 회복성 여부
- 동물별 부검 결과와 가능한 경우에는 조직 병리학적 검사 결과

6) 고찰과 결과의 해석

7) 결론

별첨 1

용어정의(definition)

급성 경구 독성(acute oral toxicity)

어떤 성분의 단일 용량 경구 투여 이후 또는 24시간 이내에 여러 용량을 투여한 이후에 나타나는 이상 반응을 의미한다.

지연 사망(delayed death)

동물이 48시간 이내에 죽지 않거나 사망 직전으로 보이지 않았지만, 그 후 14일 관찰기간 동안 사망하는 것을 의미한다.

투여 용량(dose)

투여한 시험 성분의 양을 의미한다. 용량은 실험동물의 단위 체중 당 시험 성분의 중량(예, mg/kg)으로 나타낸다.

GHS(Globally Harmonised Classification System for Chemical Substances and Mixtures).

OECD(사람 건강 및 환경), UN 위험 물품 운송에 관한 전문가 위원회(이화학적 특징), ILO(위험 요소 정보 교환)이 공동으로 추진하는 프로그램으로, IOMC(Interorganisation Programme for the Sound Management of Chemicals)이 업무를 조정한다. GHS 카테고리 분류는 다음과 같다.

- 카테고리 1 : 경구 투여시 $LD_{50} \leq 5\text{mg/kg} \cdot \text{bw}$
- 카테고리 2 : 경구 투여시 $5\text{mg/kg} \cdot \text{bw} < LD_{50} \leq 50\text{mg/kg} \cdot \text{bw}$
- 카테고리 3 : 경구 투여시 $50\text{mg/kg} \cdot \text{bw} < LD_{50} \leq 300\text{mg/kg} \cdot \text{bw}$
- 카테고리 4 : 경구 투여시 $300\text{mg/kg} \cdot \text{bw} < LD_{50} \leq 2000\text{mg/kg} \cdot \text{bw}$
- 카테고리 5 : 경구 투여시 $2000\text{mg/kg} \cdot \text{bw} < LD_{50} \leq 5000\text{mg/kg} \cdot \text{bw}$

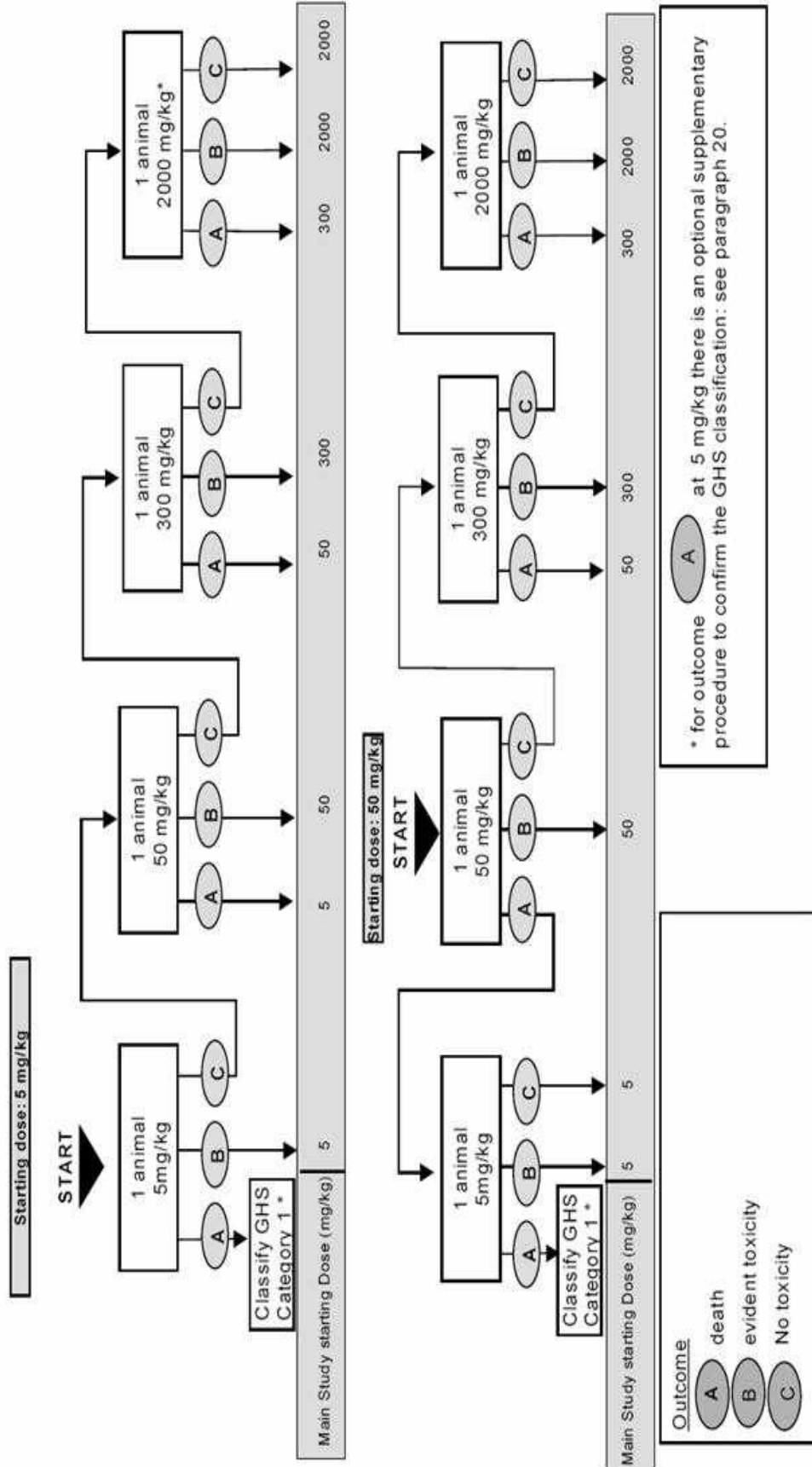
LD₅₀

경구 투여 시에 50%의 동물에서 사망을 유발할 것으로 예상되는, 통계적으로 도출한 단일 용량을 의미한다. LD₅₀ 값은 실험동물의 단위 체중 당 시험 성분의 중량(mg/kg)으로 나타낸다.

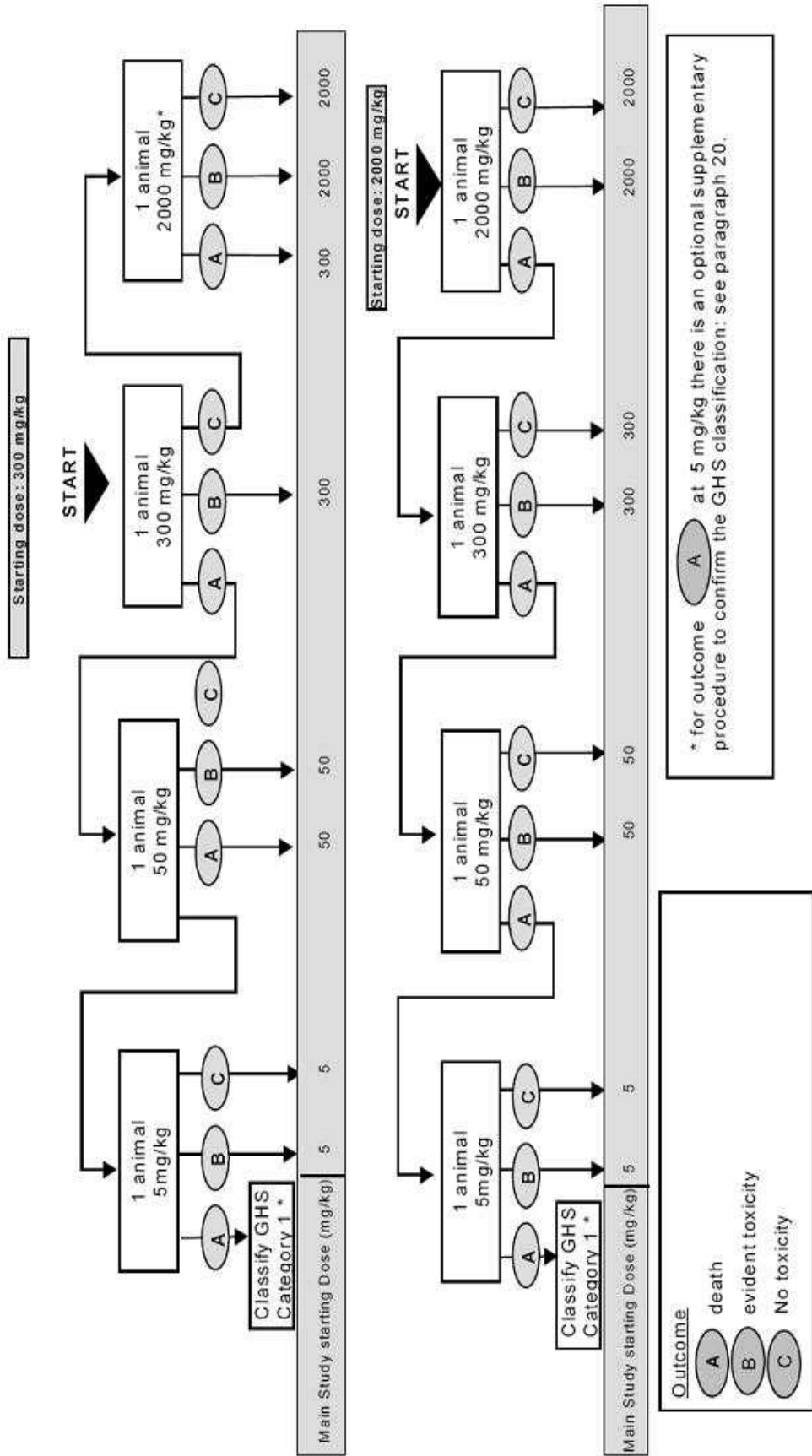
한도 용량(limit dose)

실험 시의 상한 한도에 해당되는 용량을 의미한다(2000 또는 5000 mg/kg).

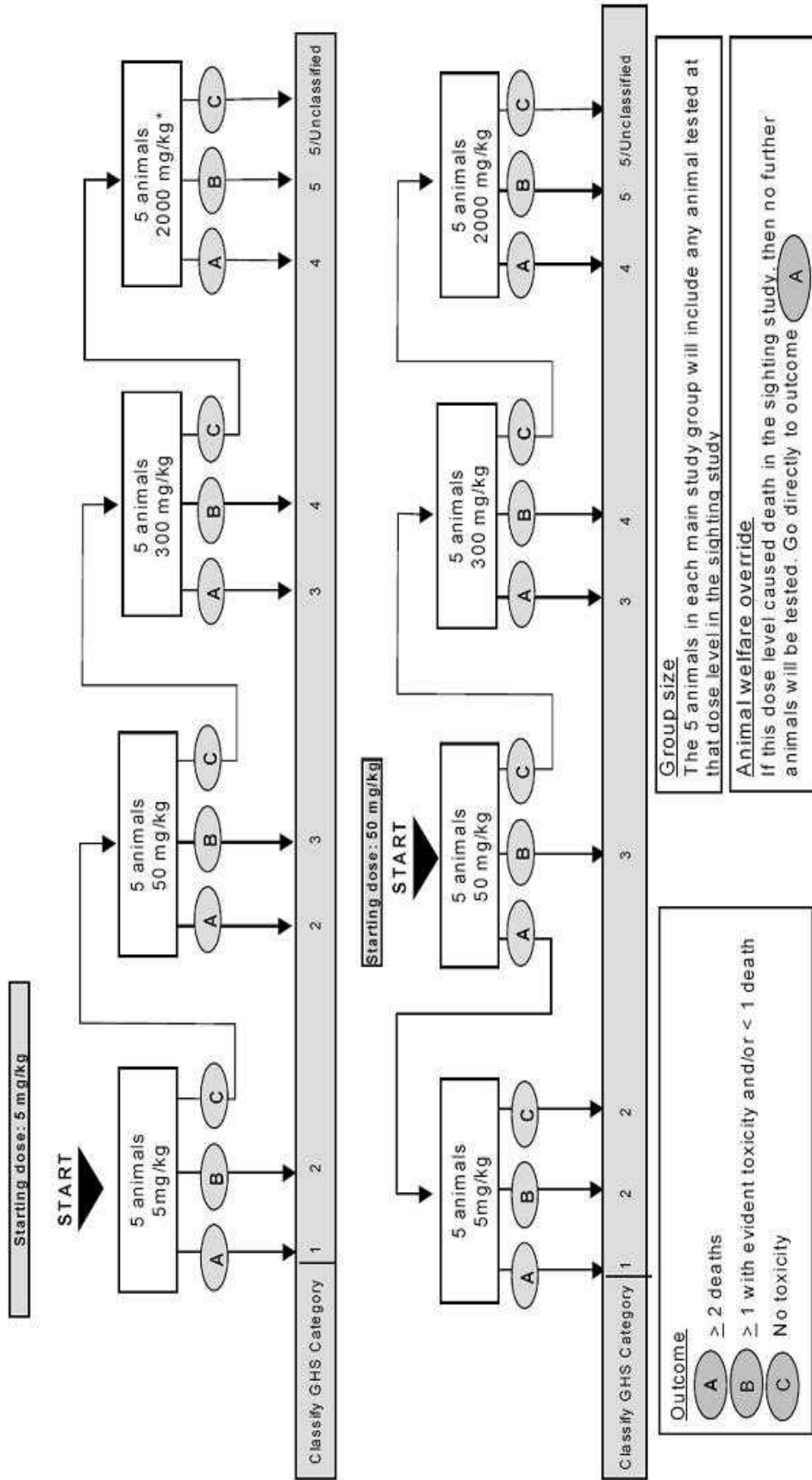
별첨 2 예비실험 흐름도



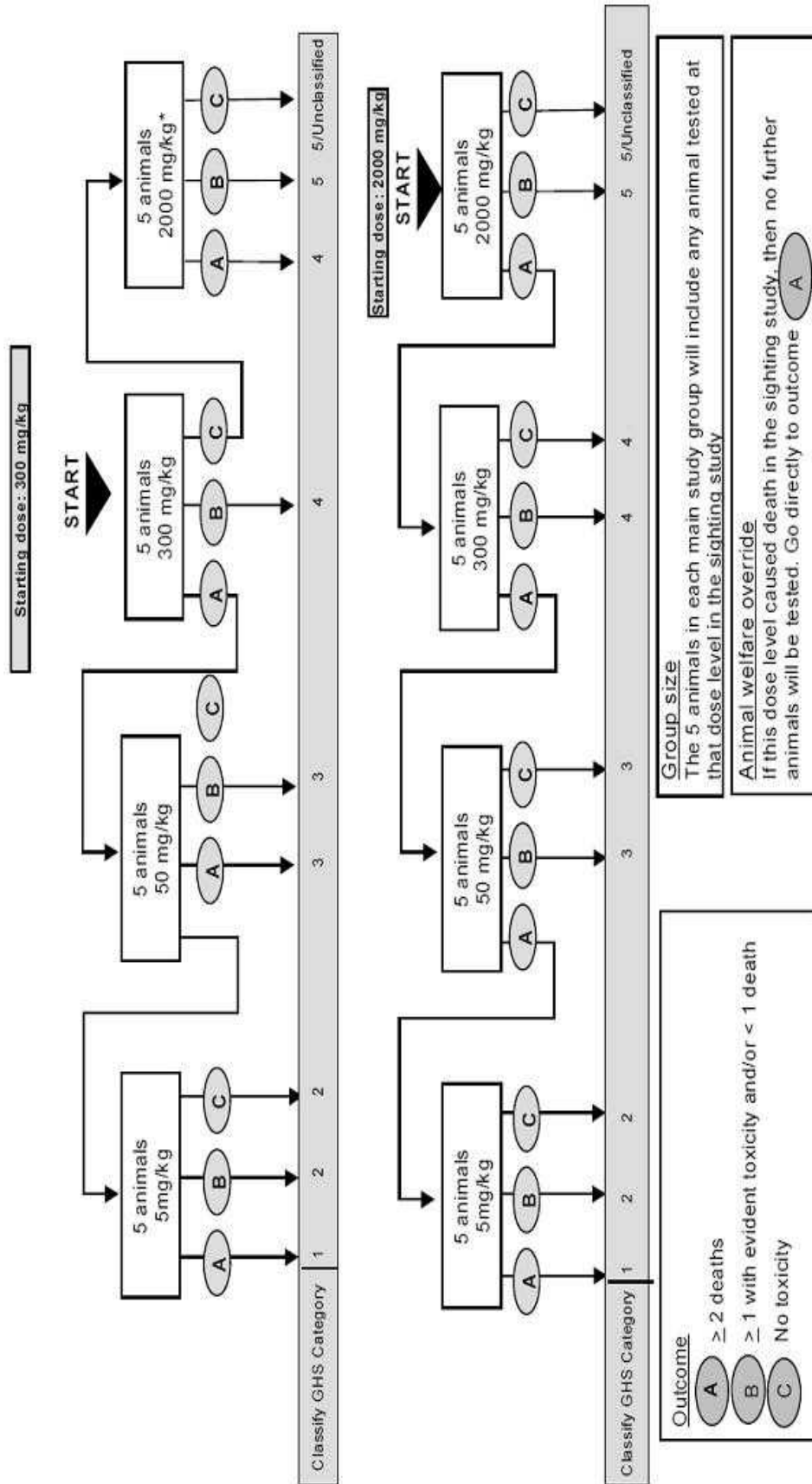
별첨 2 예비실험 흐름도



별첨 3 본 실험 흐름도



별첨 3 본 실험 흐름도



별첨 4

시험의 필요성 없이 LD₅₀값이 2000 mg/kg을 초과할 것으로 예상되는 시험 물질의 분류 기준

1. 위험 요소 카테고리 5의 기준은 급성 독성 위험이 상대적으로 낮지만 특정 상황에서는 취약 집단에 위험이 될 수 있는 시험 물질의 파악을 위한 것이다. 이들 성분은 2000-5000 mg/kg 범위에서 경구 또는 피부 LD₅₀를 가질 것으로 예상되며, 다른 경로에서는 이에 상응하는 값을 가질 것으로 예상된다. 시험 물질은 다음의 경우에 2000 mg/kg < LD₅₀ < 5000 mg/kg (카테고리 5, GHS)으로 정의되는 위험 요소 카테고리로 분류될 수 있다.

가. 사망률에 근거하여 별첨 2a-2d의 시험 계획에 따라 이 카테고리로 정해지는 경우.

나. LD₅₀가 카테고리 5의 범위일 것이라는 믿을 수 있는 증거가 이미 있거나 다른 동물 시험이나 사람에서의 독성 영향에 따라 급성으로 사람 건강에 문제가 될 우려가 있는 경우.

다. 데이터의 외삽, 추정, 측정을 통해 보다 위험한 카테고리로의 분류가 필요하지 않다고 판단되며

- 사람에서의 유의미한 독성 영향을 보여 주는 신뢰성 있는 정보가 있거나
- 경구 경로로 카테고리 4 값까지 시험했을 때 사망이 관찰되거나
- 설사, 모기립(piloerection), 또는 털을 고르지 못하는 상태 (ungroomed appearance)을 제외하고, 최대 카테고리 4값까지 시험했을 때, 유의미한 임상적 독성 징후가 있다고 전문가가 판단하거나
- 다른 동물 시험 결과를 통해 유의미한 급성 영향 가능성을 보여 주는 신뢰성 있는 정보를 전문가가 확인한 경우.

2000 mg/kg 이상 용량에서의 시험

1. 예외적으로, 그리고 규제 필요성 때문에 타당성이 있는 경우에만, 추가적으로 5000 mg/kg의 고정 용량을 고려할 수 있다(별첨 4 참조). 동물 복지 차원에서 5000 mg/kg에서 동물 시험을 실시하는 것은 권장되지 않으며, 이 시험 결과가 사람이나 동물의 건강 보호 측면과 직접적인 연관성을 가질 가능성이 높은 경우에만 이 방법을 검토한다(8).

가. 예비시험

- 1) 별첨 2에 제시된 순차적 절차에 적용되는 의사 결정 규칙을 확대하여 5000 mg/kg 용량까지 포함한다. 그러므로 예비 시험에서 5000 mg/kg을 시작 용량으로 하고 A 결과(사망)가 발생하면, 두 번째 동물을 2000 mg/kg에서 시험한다. B와 C 결과(명백한 독성이나 무독성)가 나타나면, 본 시험 시작 용량으로 5000 mg/kg으로 정한다. 마찬가지로 5000 mg/kg 이외의 용량을 시작 용량을 정한다면, 2000 mg/kg에서 B나 C 결과가 나오더라도 5000 mg/kg까지 진행한다. 이후 5000 mg/kg에서 A 결과가 나오면, 본 시험의 시작 용량을 2000 mg/kg으로 하고, B와 C 결과가 나오면 본 시험의 시작 용량을 5000 mg/kg으로 한다.

나. 본 시험

- 1) 별첨 3에 제시된 순차적 절차에 적용되는 의사 결정 규칙을 확대하여 5000 mg/kg 용량까지 포함한다. 그러므로 본 시험에서 5000 mg/kg을 시작 용량으로 하고 A 결과(사망 2건)가 발생하면, 두 번째 그룹을 2000 mg/kg에서 테스트한다. B 결과(명백한 독성 및/또는 사망 1건)와 C 결과(무독성)가 나타나면, GHS에 따라 그 성분은 미분류(unclassified)가 된다.
- 2) 마찬가지로 5000 mg/kg 이외의 시작 용량을 정한다면, 2000 mg/kg에서 C 결과가 나오더라도 5000 mg/kg까지 진행한다. 이후 5000 mg/kg에서 A 결과가 나오면 그 성분을 GHS 카테고리 5로 분류하고, B나 C 결과가 나오면 미분류로 한다.

참고문헌

- (1) British Toxicology Society Working Party on Toxicity (1984). Special report: a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity. *Human Toxicol.*, 3, 85-92.
- (2) Van den Heuvel, M.J., Dayan, A.D. and Shillaker, R.O. (1987). Evaluation of the BTS approach to the testing of substances and preparations for their acute toxicity. *Human Toxicol.*" 6, 279-291.
- (3) Van den Heuvel, M.J., Clark, D.G., Fielder, R.J., Koundakjian, P.P., Oliver, G.J.A., Pelling, D., Tomlinson, N.J. and Walker, A.P. (1990). The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD50 test. *Fd. Chem. Toxicol.* 28, 469-482.
- (4) Whitehead, A. and Curnow, R.N. (1992). Statistical evaluation of the fixed-dose procedure. *Fd. Chem. Toxicol.*, 30, 313-324.
- (5) Stallard, N. and Whitehead, A. (1995). Reducing numbers in the fixed-dose procedure. *Human Exptl. Toxicol.* 14, 315-323.
- (6) Stallard, N., Whitehead, A. and Ridgeway, P. (2000). Statistical evaluation of modifications to the fixed dose procedure (manuscript in preparation).
- (7) OECD (2000). Guidance Document on Acute Oral Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No.24.
- (8) OECD (1998). Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and

the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p.11
[<http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html>].

- (9) Lipnick, R.L., Cotruvo, J.A., Hill, R.N., Bruce, R.D., Stitzel, K.A., Walker, A.P., Chu, I., Goddard, M., Segal, L., Springer, J.A. and Myers, R.C. (1995). Comparison of the Up-and-Down, Conventional LD50, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures. *Fd. Chem. Toxicol.* 33, 223-231.

- (10) Chan P.K and A.W. Hayes (1994) Chapter 16 Acute Toxicity and Eye Irritation In: *Principles and Methods of Toxicology*. 3rd Edition. A.W. Hayes , Editor. Raven Press, Ltd. New York, USA.

II. 급성 독성 클래스 방법 (Acute Toxicity Class Method)

1. 개요

가. 이 가이드라인에 제시된 급성 독성 클래스 방법⁽¹⁾은 단계별로 한 성별의 동물 3마리를 사용하는 단계적 절차이다. 동물의 사망률과 사망 직전 상태에 따라, 시험 물질의 단회투여 독성을 판단하려면 평균적으로 2-4단계가 필요할 수 있다. 이 절차는 재현성이 있으며 매우 적은 동물을 사용하고 다른 단회투여 독성시험법과 유사한 방식으로 성분의 등급을 정할 수 있다. 급성 독성 클래스 방법은 분류 목적과 위험 요소 평가를 위해 성분의 등급을 정할 수 있도록, 적절하게 구분하여 정한 고정 용량에서 생체 측정 방식의 평가로 실시한다⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾. 1996년에 채택된 이 방법은 개별 국가⁽⁶⁾와 국제⁽⁷⁾적인 차원의 문헌에서 확보된 LD₅₀ 데이터에 대비하여 광범위한 체내 밸리데이션을 거쳤다.

나. 이 가이드라인에서 사용하는 용어의 정의는 별첨 1에 제시되어 있다.

2. 사전 고려사항

가. 부식성 또는 심각한 자극성 작용 때문에 뚜렷한 통증과 고통을 유발하는 것으로 알려진 용량의 시험 물질은 투여할 필요가 없다. 사망 직전의 동물이나 뚜렷한 통증 상태 또는 중증의 지속적 고통 징후를 보이는 동물은 인도적으로 안락사 시키고, 시험 도중에 죽은 동물과 동일한 방식으로 시험 결과의 해석 시에 검토한다.

나. 이 방법은 미리 정한 용량을 사용하며, 급성 독성을 유발하는 화학물질의 분류에 관한 시스템(GHS)에 의거하여 그 결과를 바탕으로 특정 성분의 등급을 정하고 분류할 수 있다⁽⁹⁾.

다. 원칙적으로 이 방법은 LD₅₀를 정확하게 계산하기 위한 것이 아니며, 일정 비율의 동물 사망이 이 시험의 종료시점이므로 치사가 예상되는 경우의 투여 범위를 결정할 수 있다. 최소한 2개 용량이 0%보다 높고 100%보다 낮은 사망률을 유발하는 경우에만 이 방법으로 LD₅₀ 값을

결정할 수 있다. 시험물질에 관계없이, 미리 정한 용량으로 동물 수 및 동물 상태 등에 따라 명확히 분류된 그룹의 동물에게 시험하면 실험실간 보고의 연계성이나 반복성을 향상시킬 수 있다.

- 라. 시험 시작에 앞서 시험 물질에 관한 모든 가용 정보를 검토한다. 시험 물질의 기본 정보와 화학적 구조, 그의 물리적/화학적 특징, 다른 체외 또는 체내 독성 시험 결과, 구조적 연관성이 있는 성분의 독성 데이터, 그리고 그 성분의 예상 용도 등에 관한 정보가 이에 해당된다. 이런 정보는 사람 건강 보호와 이 시험의 연관성을 결정하는데 유용하며, 적절한 시작 용량을 선정하는데 도움이 될 수 있다.

3. 시험법의 원리

- 가. 단계별로 동물을 최소한으로 사용하는 단계별 절차에 따라, 시험 물질의 분류에 필요한 급성 독성 정보를 충분히 확보한다는 것이 이 시험의 원리이다. 시험 물질은 지정 용량 가운데 하나로 하여, 실험동물 그룹에게 경구 투여한다. 단계별 절차에 따라 시험을 실시하는데, 단계별로 동일 성별의 동물 3마리(일반적으로 암컷)를 사용한다. 한 단계에서 시험 동물의 사망 유무에 따라, 다음 단계의 필요성과 방법이 결정된다.

- 추가 시험 불필요
- 동일 용량을 추가로 3마리에게 투여
- 다음 단계의 더 높은 용량 또는 더 낮은 용량을 추가로 3마리에 투여

- 나. 시험 절차에 관한 세부 사항은 별첨 2에 기술되어 있다. 이 방법은 시험 성분을 고정 LD₅₀ 기준값에 의해 정의된 일련의 독성 클래스 가운데 하나로 분류하는 판단을 내릴 수 있도록 한다.

4. 시험준비

가. 동물종의 선정

- 1) 다른 설치류를 사용할 수도 있지만, 가장 바람직한 것은 랫트이다. 일반적으로 암컷 랫트를 사용한다⁽⁸⁾. 기존 LD₅₀ 시험에 관한 문헌을 조사한 결과, 일반적으로 성별 사이의 감수성 차이가 별로 없으며, 차이가 있더라도 암컷이 약간 더 민감한 것으로 나타났기 때문이다⁽¹⁰⁾. 하지만 구조와 연관된 독성 또는 독성동태학적 특징을 알고 있으며 이에 따르면 수컷이 더 민감한 경우에는 수컷을 사용한다. 수컷을 상대로 시험을 실시한다면, 그 타당성을 제시해야 한다.
- 2) 일반적으로 실험실에서 사용하는 건강하고 젊은 성체 동물종을 사용한다. 암컷은 새끼를 낳은 적이 없고 새끼를 배지 않은 상태여야 한다. 투여 시작 시점의 동물 연령은 8주에서 12주 사이여야 하며, 몸무게는 앞서 투여한 동물의 체중 평균 대비 $\pm 20\%$ 구간에 속해야 한다.

나. 사육 및 식이조건

- 1) 실험동물 사육실의 온도는 $22^{\circ}\text{C}(\pm 3^{\circ}\text{C})$ 여야 한다. 상대 습도는 최소한 30%로 하고 실내 청소 기간 이외에는 70%를 넘지 않도록 하는 것이 바람직하나, 50-60%를 목표로 한다. 인공 조명을 사용하며, 12시간 간격으로 주야를 정한다. 일반적인 설치류 사료를 사용하며 물은 무제한 공급한다. 동물을 용량별로 그룹을 지어 케이지에 넣지만, 케이지별 동물의 수는 각 동물을 명확히 관찰하는데 방해가 되지 않아야 한다.

다. 동물 준비

- 1) 실험 조건에 순응할 수 있도록, 적어도 투여 5일 전에 동물을 무작위로 선정하고 개별적으로 식별 표시를 하며 각자의 케이지에 넣는다.

라. 시료 준비

- 1) 일반적으로 시험 물질은 농도를 달리하여 시험할 용량 범위로 일정량을 만들어 투여한다. 액상 물질이나 혼합물을 시험한다면, 일정 농도의 미희석 시험 물질을 사용하는 것이 그 성분의 위해 평가와 보다 관련성이 있을 것이며, 어떤 경우이건 최대 투여 용량을 넘지 않도록 한다. 한번에 투여할 수 있는 최대 액량은 실험동물의 크기에 따라 다르다. 설치류의 경우에는 체중 100 g 당 1 ml을 넘지 않아야 한다. 하지만 수용액인 경우에는 2 ml/100 g 까지도 고려할 수 있다. 투여 시료를 조제할 때, 가능하면 액상/현탁액/유제의 사용이 권고되는데, 바람직하게는 액상/현탁액/유제(예, 옥수수유) 순서로 하고, 다른 용매를 사용한 용액을 사용할 수 있다. 물 이외의 다른 용매를 사용하는 경우에는 그의 독성학적 특성을 알아야 한다. 사용 기간까지의 안정성이 확보되지 않았다면, 투여 직전에 조제한다.

5. 시험절차

가. 투여

- 1) 시험물질은 위관이나 적합한 삼관 캐놀라를 사용하여 경구투여(gavage) 방식으로 단일 용량을 투여한다. 또한, 한번에 투여하는 것이 곤란한 시험물질에 대해서는 24시간 이내에 분할 투여할 수도 있다. 다만, 분할하여 투여한 경우는 그 이유를 명확히 하는 것이 필요하다.
- 2) 투여에 앞서 동물을 금식시킨다(예, 렫트의 경우에는 밤새 사료를 주지 않고(물은 제외), 마우스인 경우에는 사료를 3-4시간 동안 주지 않는다(물은 제외). 금식 기간이 지난 다음에 체중을 재고 시험 성분을 투여한다. 성분 투여 이후에는 렫트의 경우에 3-4시간, 마우스는 1-2

시간 동안 추가로 사료를 주지 않을 수 있다. 일정 기간 동안 나누어 투여하는 경우에는, 기간에 따라 사료와 물을 동물에게 공급할 필요가 있을 수 있다.

나. 동물의 수와 용량

- 1) 단계별로 3마리를 사용한다. 시작 용량으로 사용할 용량은 4개 (5, 50, 300, 2000 mg/kg bw) 중 하나로 한다. 시작 용량은 투여 동물 일부의 사망을 유발할 가능성이 가장 높은 것이어야 한다. 시작 용량별 절차 흐름도가 별첨 2에 정리되어 있다.
- 2) 최고 시작 용량(2000 mg/kg bw)에서도 사망이 발생할 가능성이 없다는 정보가 있으면, 한도 시험을 실시해야 한다. 시험 물질에 관한 정보가 없다면, 동물 복지 차원에서 시작 용량을 300 mg/kg bw로 하는 것이 권장된다.
- 3) 시험물질 투여군간 시간 간격은 독성 징후의 발생, 지속 기간, 심각성에 따라 결정한다. 이전 투여 동물의 생존을 확신할 때까지, 다음 단계 용량의 동물 투여를 연기한다.
- 4) 예외적으로, 그리고 규제 필요성 때문에 타당성이 있는 경우에만, 추가적으로 5000 mg/kg 용량의 투여를 고려할 수 있다(별첨 3 참조). 동물 복지 차원에서 GHS 카테고리 5 범위(2000 - 5000 mg/kg)에서 동물 시험을 실시하는 것은 권장되지 않으며, 이 시험 결과가 사람이나 동물의 건강 또는 환경 보호 측면과 직접적인 연관성을 가질 가능성이 높은 경우에만 이 방법을 검토한다.

다. 한도 시험

- 1) 한도 시험은 해당 시험 물질이 비독성일 가능성이 있다는 정보, 즉 규제 한도 용량 이상에서만 독성을 나타낸다는 증거가 있는 경우에 적용한다. 시험 물질의 독성 정보는 독성학적 의미가 있는 것으로 알려진 성분과 그의 비율을 고려하여, 유사한 화합물이나 혼합물 또는 제품의 시험 결과에서 확보할 수 있다. 독성 정보가 거의 없거나 시험

물질이 독성을 가질 것으로 예상되는 경우에는 본 시험을 실시한다.

- 2) 2000 mg/kg bw 용량 수준에서의 한도 시험은 6마리로 실시할 수 있다(단계별로 3마리). 예외적으로는 5000 mg/kg 용량 수준에서의 한도 시험을 3마리로 실시할 수 있다(별첨 3 참조). 시험 성분 관련 사망이 발생하면, 다음 단계의 더 낮은 용량에서 추가적인 시험을 실시할 필요가 있을 수 있다.

라. 관찰

- 1) 투여 동물을 개별적으로 관찰하며, 투여 이후 30분 동안 최소 1회 관찰하고 이후 첫 24시간 동안 주기적으로 관찰하며(특히 첫 4시간 동안 주의하여 관찰), 이후에는 동물 복지 차원에서 안락사 시켰거나, 실험에서 제외된 동물을 제외하고는 시험동물을 14일 동안 매일 관찰한다. 하지만 관찰 기간을 엄격하게 고정시킬 필요는 없다. 독성 반응과 시험 시작 시간, 그리고 회복 기간을 감안해 결정하며, 그러므로 필요한 경우에는 늘어날 수도 있다. 독성 징후가 나타나고 사라지는 시기가 중요하다. 독성 징후가 지연되어 나타나는 경향이 있을 때 특히 그렇다(11). 모든 관찰 내용을 동물별 기록서에 체계적으로 기록한다.
- 2) 동물이 계속 독성 징후를 보이면, 추가 관찰이 필요하다. 이때 피부와 털, 눈, 점막, 그리고 호흡기, 자율신경계와 중추신경계, 그리고 체성운동 활동과 행동 패턴의 변화를 관찰한다. 진전, 경련, 타액 분비, 설사, 무기력, 수면, 혼수상태의 관찰에 주의를 기울인다. 사망 직전 상태인 동물과 심각한 통증이나 심각한 고통 징후를 보이는 동물은 인도적으로 안락사 시킨다. 동물을 인도적으로 안락사 시키거나 동물이 죽은 상태로 발견되면, 사망 시점을 최대한 정확하게 기록한다.

마. 체중

- 1) 시험물질을 투여하기 직전과 이후 매주 동물의 체중을 잰다. 체중 변화를 계산하고 기록한다. 체중 측정의 빈도는 그 추이를 알도록 하는

것이 원칙이므로 모든 예에 확일적으로 규정할 필요는 없다. 시험 종료 시에 생존 동물의 체중을 재고 인도적으로 안락사 시킨다.

바. 병리

- 1) 시험한 모든 동물(시험 도중에 죽은 동물이나 동물 복지 차원에서 시험 도중에 안락사 시킨 동물 포함)을 부검한다. 동물별로 모든 병리학 적 변화를 기록한다. 24시간 이상 생존한 동물에서 병리학 적 징후를 보인 장기는 현미경으로 검사한다. 유용한 정보를 얻을 수 있기 때문이다.

사. 데이터

- 1) 동물별로 데이터를 제시한다. 또한 모든 데이터를 도표 형식으로 정리 하여, 시험 그룹별로 전체 동물의 수, 독성 징후를 보인 동물의 수, 시험 도중에 죽은 동물이나 인도적으로 안락사 시킨 동물의 수, 동물별 사망 시점, 독성 영향에 대한 설명과 경과, 그리고 회복성, 부검 결과를 기술한다.

6. 결과 보고

가. 시험보고서에는 다음과 같은 정보를 포함하여야 한다.

- 1) 시험 물질
 - 물리적 특성, 순도, 그리고 관련성이 있는 경우에는 이화학적 특징 (이성질체 포함)
 - 기본 식별 정보(CAS 번호 포함)
- 2) 용매
 - 물 이외의 용매를 사용하는 경우에는 그 용매 선택의 이유
- 3) 실험동물
 - 종/계통

- 알고 있는 경우에는 동물의 미생물학적 상태
- 동물의 수, 연령, 성별(암컷 대신에 수컷을 사용한 경우 그 이유)
- 출처, 사육 조건, 사료 등

4) 시험조건

- 시험 물질의 물리적 상태에 대한 설명, 시험 물질의 조성에 대한 설명
- 투여량과 투여시기를 포함하여 시험 물질의 투여에 관한 정보
- 사료와 물의 품질(사료 종류/출처, 물의 출처 포함)
- 시작 용량 선정 근거

5) 결과

- 동물별 반응 데이터와 용량 수준의 도표화(즉, 사망을 포함하여 독성 징후를 보인 동물과 독성 징후의 특성, 심각도, 지속 기간)
- 체중과 체중 변화
- 투여 당일의 동물 체중과 이후 주간 간격과 사망 또는 인도적 안락사 당시의 체중
- 시험 도중 사망한 경우에는 그 일시
- 독성 징후 발현 시간과 동물별로 독성 징후의 회복성 여부
- 동물별 부검 결과와 가능한 경우에는 조직 병리학적 검사 결과

6) 고찰과 결과의 해석

7) 결론

별첨 1

용어정의(definition)

급성 경구 독성(acute oral toxicity)

어떤 성분의 단일 용량 경구 투여 이후 또는 24시간 이내에 여러 용량을 투여한 이후에 나타나는 이상 반응을 의미한다.

지연 사망(delayed death)

동물이 48시간 이내에 죽지 않거나 사망 직전으로 보이지 않았지만, 그 후 14일 관찰기간 동안 사망하는 것을 의미한다.

투여 용량(dose)

투여한 시험 성분의 양을 의미한다. 용량은 실험동물의 단위 체중 당 시험 성분의 중량(예, mg/kg)으로 나타낸다.

GHS(Globally Harmonised Classification System for Chemical Substances and Mixtures).

OECD(사람 건강 및 환경), UN 위험 물품 운송에 관한 전문가 위원회(이화학적 특징), ILO(위험 요소 정보 교환)이 공동으로 추진하는 프로그램으로, IOMC(Interorganisation Programme for the Sound Management of Chemicals)이 업무를 조정한다. GHS 카테고리 분류는 다음과 같다.

- 카테고리 1 : 경구 투여시 $LD_{50} \leq 5\text{mg/kg} \cdot \text{bw}$
- 카테고리 2 : 경구 투여시 $5\text{mg/kg} \cdot \text{bw} < LD_{50} \leq 50\text{mg/kg} \cdot \text{bw}$
- 카테고리 3 : 경구 투여시 $50\text{mg/kg} \cdot \text{bw} < LD_{50} \leq 300\text{mg/kg} \cdot \text{bw}$
- 카테고리 4 : 경구 투여시 $300\text{mg/kg} \cdot \text{bw} < LD_{50} \leq 2000\text{mg/kg} \cdot \text{bw}$
- 카테고리 5 : 경구 투여시 $2000\text{mg/kg} \cdot \text{bw} < LD_{50} \leq 5000\text{mg/kg} \cdot \text{bw}$

LD₅₀

경구 투여 시에 50%의 동물에서 사망을 유발할 것으로 예상되는, 통계적으로 도출한 단일 용량을 의미한다. LD₅₀ 값은 실험동물의 단위 체중 당 시험 성분의 중량(mg/kg)으로 나타낸다.

한도 용량(limit dose)

시험 시의 상한 한도에 해당되는 용량을 의미한다(2000 또는 5000 mg/kg).

별첨 2

시작 용량 각각에 대해 준수할 절차

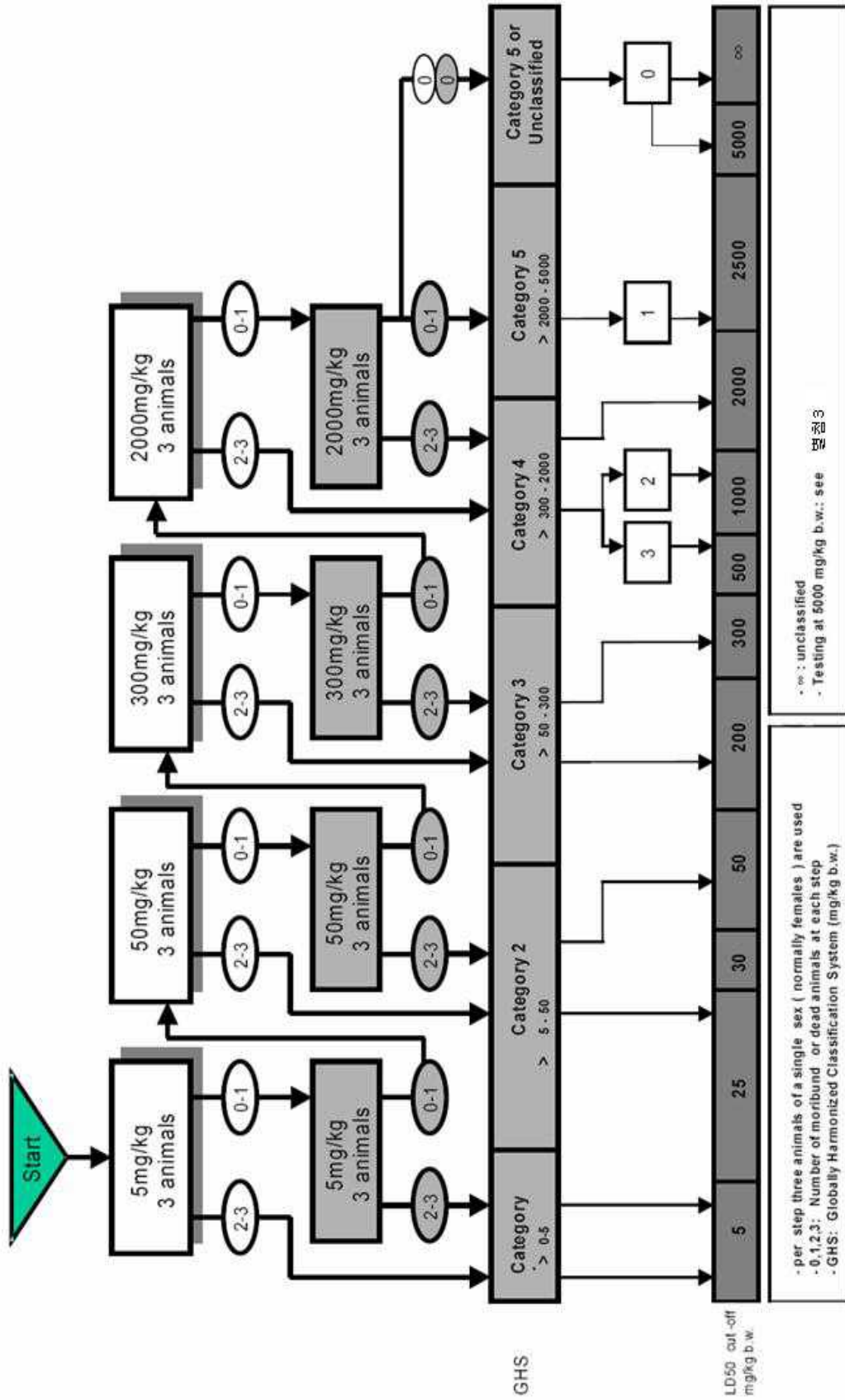
1. 공통

가. 시작 용량 각각에 대하여 준수해야 할 절차가 이 별첨에 포함된 각 시험 계획에 제시되어 있다.

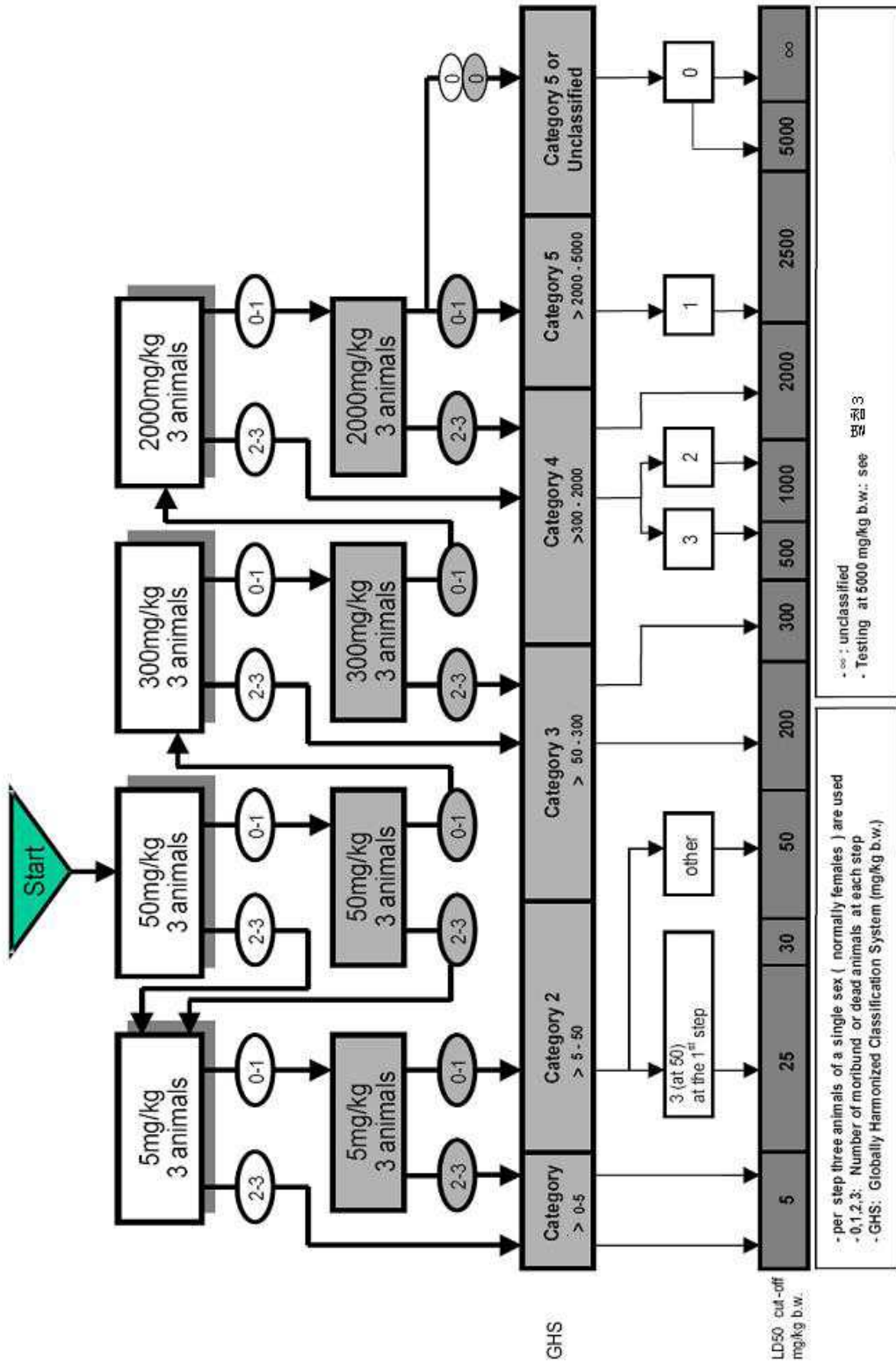
- 별첨 2a: 시작 용량 5 mg/kg · bw
- 별첨 2b: 시작 용량 50 mg/kg · bw
- 별첨 2c: 시작 용량 300 mg/kg · bw
- 별첨 2d: 시작 용량 2000 mg/kg · bw

인도적으로 안락사 시킨 동물이나 사망 동물의 수에 따라, 표시 화살표를 따라 시험을 진행한다.

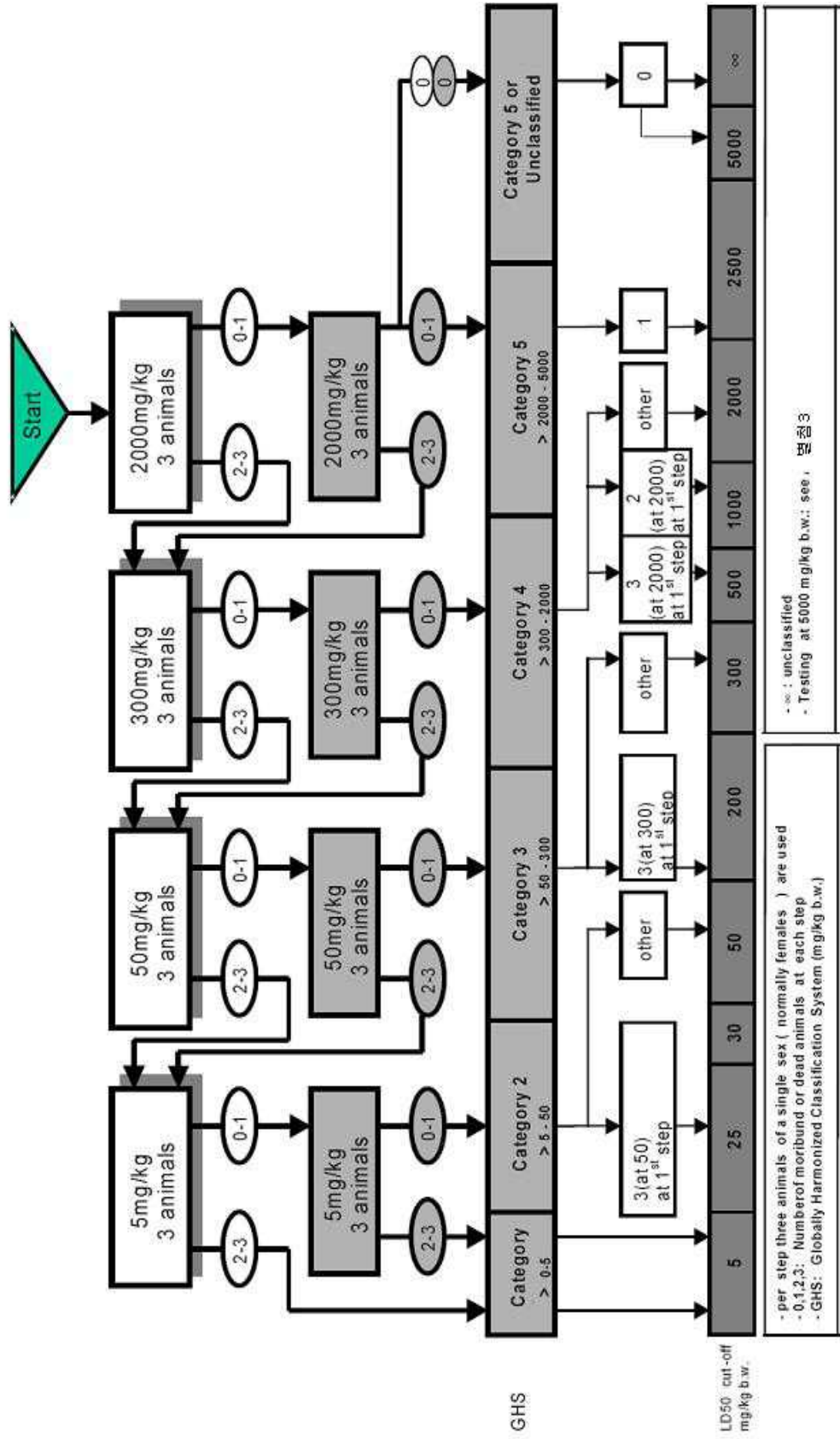
별첨 2a 시작 용량이 5 mg/kg bw인 경우의 시험 절차



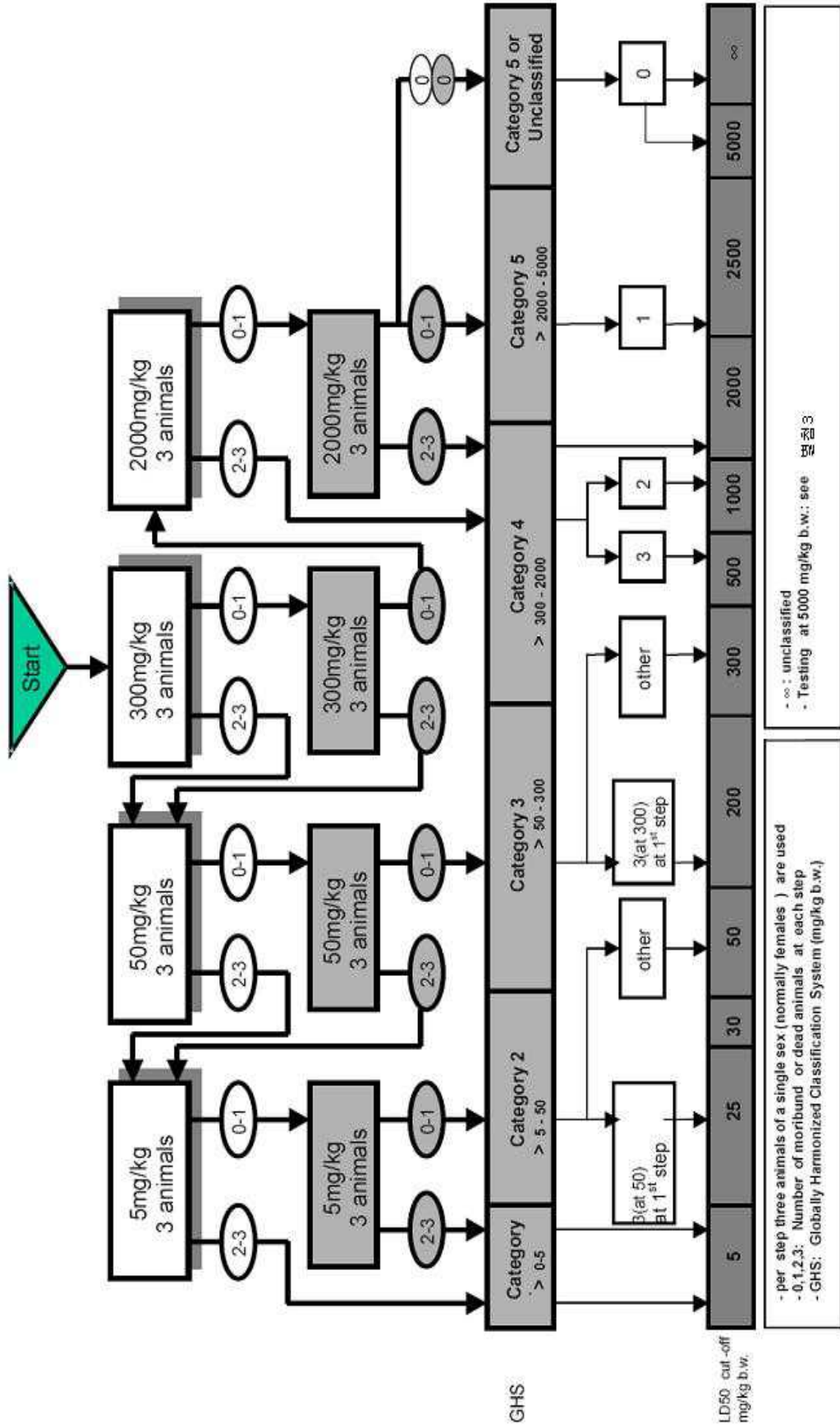
별첨 2b 시작 용량이 50 mg/kg bw인 경우의 시험 절차



별첨 2d 시작 용량이 2000 mg/kg bw인 경우의 시험 절차



별첨 2c 시작 용량이 300 mg/kg bw인 경우의 시험 절차



별첨 3

시험의 필요성 없이 LD₅₀값이 2000 mg/kg을 초과할 것으로 예상되는 시험 성분의 분류 기준

1. 위험 요소 카테고리 5의 기준은 급성 독성 위험이 상대적으로 낮지만 특정 상황에서는 취약 집단에 위험이 될 수 있는 시험 성분의 과약을 위한 것이다. 이들 성분은 2000-5000 mg/kg 범위에서 경구 또는 피부 LD₅₀를 가질 것으로 예상되며, 다른 경로에서는 이에 상응하는 값을 가질 것으로 예상된다. 시험 성분은 다음의 경우에 2000 mg/kg < LD₅₀ < 5000 mg/kg (카테고리 5, GHS)으로 정의되는 위험 요소 카테고리로 분류될 수 있다.
 - 가) 사망률에 근거하여 별첨 2a-2d의 시험 계획에 따라 이 카테고리로 정해지는 경우.
 - 나) LD₅₀가 카테고리 5의 범위일 것이라는 믿을 수 있는 증거가 이미 있거나 다른 동물 시험이나 사람에서의 독성 영향에 따라 급성으로 사람 건강에 문제가 될 우려가 있는 경우.
 - 다) 데이터의 외삽, 추정, 측정을 통해 보다 위험한 카테고리로의 분류가 필요하지 않다고 판단되며
 - 사람에서의 유의미한 독성 영향을 보여 주는 신뢰성 있는 정보가 있거나
 - 경구 경로로 카테고리 4 값까지 시험했을 때 사망이 관찰되거나
 - 설사, 모기립(piloerection), 또는 털을 고르지 못하는 상태 (ungroomed appearance)을 제외하고, 최대 카테고리 4값까지 시험했을 때, 유의미한 임상적 독성 징후가 있다고 전문가가 판단하거나
 - 다른 동물 시험 결과를 통해 유의미한 급성 영향 가능성을 보여 주는 신뢰성 있는 정보를 전문가가 확인한 경우.
2. 동물 복지 차원에서 카테고리 5 범위(5000 mg/kg)에서의 동물 시험은 권장되지 않으며, 이 시험의 결과가 사람 또는 동물 건강 보호와 직접적인 연관성이 있을 가능성이 높은 경우에만 검토한다⁽⁹⁾. 이 경우, 더 높은 용량에서는 추가 시험을 하지 않는다.

3. 5000 mg/kg 용량에서의 시험이 필요한 경우, 한 단계만(즉, 3마리) 요구된다. 첫 투여 동물이 죽으면, 투여 용량을 별첨 2의 흐름도에 따라 2000 mg/kg에서 진행한다. 첫 동물이 생존하면, 추가로 2마리에 투여한다. 3마리 가운데 1마리만 죽으면, LD₅₀ 값은 5000 mg/kg을 초과하는 것으로 예상된다. 두 마리 모두 죽으면, 2000 mg/kg에서 투여를 진행한다.

참고문헌

- (1) Roll R., Hoer-Bosse Th. And Kayser D. (1986). New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. Toxicol. Lett., Suppl. 31, 86.
- (2) Roll R., Riebschl?er M., Mischke U. and Kayser D. (1989). Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizitat von Chemikalien. Bundesgesundheitsblatt 32, 336-341.
- (3) Diener W., Sichha L., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1994). The Biometric Evaluation of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 68, 559-610.
- (4) Diener W., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1995). The Biometric Evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 729-734.
- (5) Diener W., and Schlede E. (1999) Acute Toxicity Class Methods: Alternatives to LD/LC50 Tests. ALTEX 16, 129-134.
- (6) Schlede E., Mischke U., Roll R. and Kayser D. (1992). A National Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method - An Alternative to the LD₅₀ Test. Arch. Toxicol. 66, 455-470.
- (7) Schlede E., Mischke U., Diener W. and Kayser D. (1994). The International Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 659-670.
- (8) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19.
- (9) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System

For Human Health And Environmental Effects Of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p.11

[<http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html>].

- (10) Lipnick R L, Cotruvo, J A, Hill R N, Bruce R D, Stitzel K A, Walker A P, Chu I; Goddard M, Segal L, Springer J A and Myers R C (1995) Comparison of the Up-and Down, Conventional LD₅₀, and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. *Fd. Chem. Toxicol* 33, 223-231.
- (11) Chan P.K. and A.W. Hayes. (1994). Chap. 16. Acute Toxicity and Eye Irritancy. *Principles and Methods of Toxicology*. Third Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd., New York, USA.