

등록번호

안내서-0753-01

# 화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인 (III) (민원인 안내서)

## - 안점막자극시험 -

소각막을 이용한 안점막자극시험법(BCOP 시험법)  
(Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Methods)

2014. 07.



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

독성평가연구부 특수독성과

# 지침서·안내서 제·개정 점검표

명칭

화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인(Ⅲ) (민원인 안내서)

아래에 해당하는 사항에 체크하여 주시기 바랍니다.

<b>등록대상 여부</b>	<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.		
<b>지침서·안내서 구분</b>	<input type="checkbox"/> 내부적으로 행정사무의 통일을 기하기 위하여 반복적으로 행정사무의 세부기준이나 절차를 제시하는 것입니까? (공무원용)	<input type="checkbox"/> 예(☞ <b>지침서</b> ) <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(☞ <b>안내서</b> ) <input type="checkbox"/> 아니오
<b>기타 확인 사항</b>	<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.	
<b>상기 사항에 대하여 확인하였음.</b>		
<b>2017년 5월 31일</b>		
<b>담당자</b> <b>확 인(부서장)</b>		<b>안 일 영</b> <b>이 종 권</b>

이 안내서는 화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인(Ⅲ)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 2014년 7월 17일 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	B1-2011-4-001	2011.6.	화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인(III) 제정
2	B1-2014-4-002	2014.7.17	화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인(III) 개정
3	안내서-0753-01	-	「식약처 지침서등의 관리에 관한 규정」 개정에 따른 일괄 재분류 (규제개혁담당관실-3761호,2017.5.16)

## 목 차

I. 서론 .....	1
II. 개요 .....	3
III. 유의사항 .....	5
IV. 시험의 원리 .....	8
V. 시험절차 .....	10
VI. 자료와 보고 .....	13
VII. 결과보고 .....	16
VIII. 맺음말 .....	17
IX. 용어정의 .....	18
X. 참고문헌 .....	21
부록 1. BCOP 시험법 예측 능력 .....	24
부록 2. BCOP 시험법 숙련을 위한 시험물질 .....	25
부록 3. 장치 .....	27
3-1. BCOP 각막 홀더 .....	27
3-2. Opacitometer .....	28

# 「화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인」(III) 개정

## I. 서론

### 1. 도입

화장품 안전성 평가에 있어 동물대체시험법의 활용이 국제적으로 증가함에 따라 표준화된 동물대체시험법 가이드라인의 요구가 높아지고 있다. 본 가이드라인은 토끼를 이용한 안점막자극시험의 완전한 동물대체시험법으로 활용될 수는 없으나, 소각막의 혼탁 유발 및 투과성 증가를 측정하여 심한 안자극 및 비자극 물질을 판정할 수 있는 방법을 제시하고 있다.

본 가이드라인은 경제협력개발기구(OECD) 시험법 가이드라인 437번(Bovine Corneal Opacity and Permeability Test)에 근거한다.

### 2. 추진배경

최근 경제협력개발기구(OECD) 시험법 가이드라인 437번: BCOP assay (2009년 제정, 2013년 개정)이 개정됨에 따라 이를 반영하여 우리처에서 발간한 「화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인(III) : 소각막을 이용한 안점막자극시험법(BCOP 시험법)(2011년 제정)」을 개정하고자 한다.

### 3. 주요내용

가. 시험법 목적의 추가

나. 알코올류, 케톤류, 고체류 시험물질에 대한 결과 판정 한계점 기술

다. 단일물질(substance) 및 복합물질(mixture)에 대한 적용 가능 기술

라. '계면활성제'와 '계면활성제 포함 혼합물' 용어 추가

마. '양성물질'에 대한 정의와 목적 기술

바. 판정기준 변경

2011 제정	2014 개정
시험 결과(IVIS점수) ○ 55.1이상 → 심한 안자극(GHS 기준 category 1) ○ 55.1 미만 → 판정불가	시험 결과(IVIS점수) ○ 3 이하 → 비자극(GHS 기준 No category) ○ 55 초과 → 심한 안자극(GHS 기준 category 1) ○ 3 초과, 55 이하 → 판정불가

사. 시험의 타당성 기준 명시

아. '용어의 정의' 내용 보완

자. 부록 1(시험법의 예측력 결과) 추가

차. 부록 2(숙련도 확인 시험) 내용 보완

카. 부록 3(BCOP용 장비 소개) 내용 보완

## II. 개 요

1. 미국동물대체시험법검증센터(Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods: ICCVAM)는 유럽동물대체시험법검증센터(European Centre for the Validation of Alternative Methods: ECVAM)와 일본동물대체시험법검증센터(Japanese Center for the Validation of Alternative Methods: JaCVAM)의 협조하에 소적출 각막의 혼탁 및 투과성시험(Bovine Corneal Opacity and Permeability Test: BCOP)을 2006년과 2010년에 평가하였다<sup>(1)(2)</sup>. 첫번째 평가에서는 BCOP 시험법이 심한 안손상을 유발하는 화학물질(단일물질 및 복합물질)을 판별하는데 사용될 수 있는지에 대해 평가되었고<sup>(1)</sup>, 두번째 평가에서는 BCOP 시험법이 안자극 또는 심한 안손상을 유발하지 않는 화학물질(단일물질 및 복합물질)을 판별하는데 사용될 수 있는지에 대해 평가되었다<sup>(2)</sup>. BCOP 검증 데이터베이스에는 총 113개의 단일물질과 100개의 복합물질에 대한 자료를 포함하고 있다<sup>(2)(3)</sup>. 시험법 평가자료 및 전문가들의 검토를 통해, 본 시험법이 UN GHS(United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals)<sup>(4)</sup>에서 정의된 것과 같이, 심한 안손상을 유발하는 화학물질(단일물질 및 복합물질)과 안자극 또는 심한 안손상을 유발하지 않는 화학물질(단일물질 및 복합물질)을 정확하게 판별할 수 있는 방법이라고 결론지어졌다. 따라서 본 시험법은 두 가지 목적을 위해 사용될 수 있는 과학적으로 유효한 시험법으로 승인되었다. 심한 안손상은 안조직 손상 또는 심각한 시력저하를 말하며, 이는 안구 표면에 물질을 적용한 후 21일 이내에 회복되지 않는 심한 물리적 퇴화를 뜻한다. 심한 안손상을 유발하는 시험물질은 UN GHS Category 1에 해당된다. 한편, 안자극 또는 심한 안손상을 유발하지 않는 화학물질은 UN GHS No Category(비자극)로 정의된다. 본 가이드라인은 BCOP 시험법에 대한 평가결과를 기반으로 하여 BCOP 시험법의 활용도와 제한점을 담고 있다. 2011년 제정본과 비교하여 개정된 주요 내용은 다음과 같다.

- UN GHS의 비자극(No Category) 화학물질 판별을 위한 BCOP 시험법 적용
- 알코올, 케톤, 고체에서의 단일물질 및 복합물질의 시험법 적용 가능성 명시
- 계면활성제 및 계면활성제 포함 혼합물에 대한 시험방법 명시
- 양성대조군에 대한 정의
- BCOP 시험법 판정기준
- 시험의 타당성 기준 명시
- 시험보고서에 필요한 내용 개정



- 용어의 정의 개정
- BCOP 시험법의 예측력 내용 추가(부록1)
- 숙련도 확인용 시험물질 목록 개정(부록 2)
- BCOP용 장비 소개 내용 보완(부록3)

2. 다양한 종류의 화학물질에 대한 어떤 하나의 *in vitro* 안자극시험이 토끼를 이용한 *in vivo* Draize 안점막자극시험을 대체할 수는 없다는 것이 현재 일반적으로 받아들여지는 견해이다. 하지만, 단계적인 시험전략 내에서 여러 개의 대체시험법을 잘 조합하여 실시하는 경우 *in vivo* 안점막자극시험을 대신할 가능성이 있다<sup>(5)</sup>. 하향식 접근방식(Top-down approach)<sup>(5)</sup>은 기존 정보에 근거하여 시험물질이 강한 안점막 자극을 가질 것으로 예상될 경우를 위해 설계되었고, 상향식 접근방식(Bottom-up approach)<sup>(5)</sup>은 시험물질이 안자극을 일으키지 않는 것으로 예상될 경우를 위해 설계되었다. BCOP 시험법은 눈에 대한 유해성 물질 분류와 화학물질 표시를 위해 특정 조건과 제한 조건 하에서 활용될 수 있는 *in vitro* 시험법이다. 본 시험법은 토끼를 이용한 안점막자극시험에 대한 독립적인 대체시험방법으로 검증되지는 않았지만, 추가시험 없이 심한 안손상을 유발하는 화학물질(UN GHS Category 1과 같은 물질) 구별을 위한 하향식 접근방식 시험전략의 초기 시험법으로 추천된다<sup>(4)(5)</sup>. BCOP 시험법은 상향식 접근방식과 같은 시험전략에서도<sup>(5)</sup> 안자극 또는 심한 안손상을 유발하지 않는 화학물질을 구별하기 위한 시험법으로도 추천된다<sup>(4)</sup>. 그러나 BCOP 시험법을 이용하여 심한 안손상을 유발하는 화학물질 또는 안자극 및 심한 안손상을 유발하지 않는 화학물질로 확정할 수 없는 물질이라면 확실한 분류를 위해 추가시험(*in vitro* 또는 *in vivo*)을 수행해야 한다.

3. 본 가이드라인의 목적은 적출된 소각막을 이용하여 시험물질의 눈 혼탁 유발 및 투과도 증가를 측정함으로써 눈에 유해할 수 있는 시험물질을 평가하는 과정을 포함하고 있다. 각막에 대한 독성은 (i) 빛 투과도의 감소(혼탁도)와 (ii) 플루오레세인나트륨 투과의 증가(투과도)에 의해 평가된다. 시험물질의 안점막자극은 측정된 혼탁도와 투과도를 가지고 계산된 '안점막자극지수(In Vitro Irritancy Score, IVIS)'로 표시되며, IVIS는 시험물질의 자극 정도를 분류하는데 사용된다.

### III. 유의사항

1. 본 가이드라인은 미국동물대체시험법검증센터(ICCVAM)의 BCOP 프로토콜을 근거로 한다. BCOP 프로토콜은 'In Vitro 과학연구소(Institute for In Vitro Sciences, IIVS)'의 프로토콜과 INVITTOX 프로토콜 124<sup>(8)</sup>에서 얻어진 자료를 바탕으로 개발된 것이다<sup>(6)(7)</sup>. INVITTOX 프로토콜 124는 유럽 공동체(European Community)의 후원으로 1997년부터 1998년까지 수행되었던 사전검증연구에 사용된 프로토콜이다. 이 두 프로토콜은 Gautheron 외<sup>(9)</sup>가 처음으로 보고한 BCOP 시험법을 근거로 하였다.
2. BCOP 시험법은 심한 안손상을 유발하는 화학물질 구별에 사용할 수 있다. 이러한 화학물질은 'UN GHS Category 1'<sup>(4)</sup>로 정의된다. 이러한 목적으로 사용 시, UN GHS 분류체계<sup>(3)</sup>에 따라 분류한 것(토끼를 이용한 안점막자극시험 자료)과 비교하면, BCOP 시험법은 전체적으로 79%(150/191)의 정확성을 나타내며 25%(32/126)의 위양성율과 14%(9/65)의 위음성율을 가지고 있다 (부록 1, 표 1 참고). 특정 화학적 물질(알콜류와 케톤류) 또는 물리적 물질(고체류) 군에 속한 시험물질을 자료에서 제외하면 본 BCOP 시험법은 UN GHS 분류 체계<sup>(3)</sup>를 따라 분류할 경우 전체적으로 85%(111/131)의 정확성을 가지며 20%(16/81)의 위양성율과 8%(4/50)의 위음성율을 나타낸다. 심한 안손상을 유발하는 화학물질(UN GHS Category 1)의 판별을 위해 사용되는 BCOP 시험법의 잠재적인 단점은 검증자료에서 관찰된 것과 같이 알콜류 및 케톤류에 대한 높은 위양성율과 고체류에 대한 높은 위음성율이다<sup>(1)(2)(3)</sup>. 그러나 모든 알콜류 및 케톤류가 BCOP 시험법에서 위양성으로 나왔던 것은 아니고, 일부 분은 'UN GHS Category 1'로 정확하게 예측되기 때문에 이 두 가지 화학작용기(functional group)는 이 시험법의 화학물질 적용 범위(applicability domain)에서 제외되지 않는다. 본 가이드라인을 사용할 때 알콜류 또는 케톤류에서 나타날 수 있는 위양성을 수용할 것인지 또는 증거의 가중치(weight-of-evidence) 접근법으로 추가시험을 수행할 것인지를 결정해야 한다. 고체류의 위음성율에 관해서는, in vivo Draize 안자극시험시 고체류는 다양하고 극단적인 노출 조건을 초래할 수 있으며, 이는 고체류의 실제 자극성 판별과 상관성 없는 예측을 도출할 수 있다<sup>(10)</sup>. 심한 안손상을 유발하는 화학물질(UN GHS Category 1) 판별에 의하면, ICCVAM 검증 자료<sup>(2)(3)</sup>에서 확인된 고체물질이 위음성이라 하더라도 'UN GHS No Category' 구분하는 기준인  $IVIS \leq 3$  결과를 나타내는 경우는 없었다. 더 나아가,  $3 < IVIS \leq 55$ 의 결과를 가진 모든 시험물질은 규제 요구사항에 따라 증거의 가중치(weight-of-evidence) 접근방식에 따른 순차적인 시험전략으로 적절하게 검증된 in vitro 시험법을 이용하

여 재시험을 실시하고, 최종 선택으로 토끼를 이용한 시험을 통해 재확인되기 때문에 BCOP 시험법의 위음성은 중요하지 않다. BCOP 시험법으로 일부 고체 화학물질들은 'UN GHS Category 1'으로 정확하게 예측되고 있기 때문에 고체라는 물리적 상태가 시험법의 화학물질 적용 범위(applicability domain)에서 제외되지는 않는다. 시험자들은 모든 종류의 화학물질에 대해서 이 시험법을 적용할 수 있으며,  $IVIS > 55$ 의 결과는 추가 시험 없이도 심한 안손상 유발 반응으로 정의된 'UN GHS Category 1'로 받아들인다. 하지만, 앞에서 기술된 바와 같이, 알콜류 또는 케톤류에서 얻어진 양성 결과는 위양성의 가능성을 고려하여 신중하게 해석되어야 한다.

3. 본 BCOP 시험법은 안자극 또는 심한 안손상에 대한 UN GHS 분류<sup>(4)</sup>가 필요하지 않는 물질을 판별하는데도 사용될 수 있다. 이러한 목적으로 사용 하는 경우, UN GHS 분류체계에 따라 분류된 토끼를 이용한 안점막자극시험 결과와 비교할 때, BCOP 시험법은 전체적으로 69%(135/196)의 정확성을 가지며 69%(61/89)의 위양성율과 0%(0/107)의 위음성율을 나타내고 있다<sup>(3)</sup>(부록 2, 표 2 참고). 위양성율이 높게 측정되었으나( $IVIS > 3$ 의 결과를 나타낸 in vivo 시험의 'UN GHS No Category' 화학물질),  $3 < IVIS \leq 55$ 의 결과를 나타낸 모든 시험물질은 규정에 따라 증거의 가중치(weight-of-evidence) 접근방식에 따른 순차적인 시험전략을 적용하여 다시 충분히 검증된 in vitro 시험들을 이용하여 시험을 실시하고, 또는 최종 선택으로 토끼를 이용한 시험을 통해서 재확인되기 때문에 위양성은 중요하게 여겨지지 않는다. BCOP 시험법은 안자극 또는 심한 안손상을 유발하지 않는 화학물질(UN GHS No Category)을 판별하기 위한 목적으로 케톤류, 고체류를 시험하는 경우에도 특별한 문제점은 없는 것으로 나타났다<sup>(3)</sup>. 시험자들은 모든 종류의 화학물질의 판별에 이 시험법을 사용할 수 있으며, 이를 통해 음성결과 ( $IVIS \leq 3$ )는 'UN GHS No Category'로 표시한다. BCOP 시험법은 안자극 또는 심한 안손상을 유발하지 않는 화학물질을 정확하게 31%만 구별할 수 있기 때문에 민감도가 비슷하고 더 높은 특이성을 갖는 검증된 in vitro 시험법이 있는 경우 BCOP 시험법은 상향식 접근방식(Bottom-up approach)<sup>(5)</sup>에서 초기에 선택하는 시험법은 아니다.
4. BCOP 검증 자료는 총 113개의 단일물질과 100개의 복합물질에 대한 결과를 가지고 있다<sup>(2)(3)</sup>. 따라서 BCOP 시험법은 단일물질과 복합물질 모두에 적용 가능한 것으로 여겨진다.
5. BCOP 시험법에서 많은 수의 UN GHS Category 1 물질이 UN GHS Category 2, 2A, 또는 2B 물질로 판별되었고 UN GHS No Category 물질이 UN GHS Category

2, 2A, 또는 2B 물질로 판별<sup>(2)(3)</sup>되었다. 따라서, BCOP 시험법은 안자극 물질(UN GHS Category 2 또는 2A)을 판별하거나 약한 안자극 물질(UN GHS Category 2B)을 판별하는 방법으로 추천하지 않는다. 이러한 물질들은, 다른 적절한 시험법을 이용한 추가 시험이 필요하다.

6. 소의 눈과 각막을 이용하는 모든 과정은 동물유래 검체(조직과 조직액 포함)를 다루는 것에 대한 시험기관의 규정과 절차를 준수해야 한다. 보편적인 실험실 주의사항을 마련하는 것을 추천한다<sup>(11)</sup>.
7. BCOP 시험법은 결막과 홍채에 대한 손상을 고려하지는 않지만, 각막에 대한 영향을 다루고 있어, UN GHS를 위한 *in vivo* 분류의 중요한 지표이다. BCOP 시험법 자체로는 각막 손상의 가역성을 판정할 수 없다. 다만, 토끼를 이용한 안점막자극시험을 근거로 하여, 각막 손상의 초기 심각성의 평가를 통해 일부 비가역적 영향을 확인할 수 있다고 제안되어져 왔다<sup>(12)</sup>. 그러나 초기 심각한 손상과는 관련이 없이 일어나는 비가역적인 영향을 이해하기 위해서는 추가적인 과학적 지식이 필요하다. 마지막으로 이 시험법은 눈을 통한 노출을 통해 전신 독성의 가능성을 평가하는데는 활용될 수 없다.
8. 본 시험법은 새로운 지식과 데이터가 축적되면 주기적으로 개정될 것이다. 예를 들어 조직병리학은 각막 손상에 대한 좀 더 완전한 규명이 필요할 때 유용하게 활용될 수 있다. OECD 가이드선스 문서 160<sup>(13)</sup>에 제시된 대로, 본 시험법의 정확성을 더욱 개선하기 위하여 데이터베이스와 판정기준을 개발하는데 활용하기 위해 각막을 보존하고 조직병리학적 검체를 준비하는 것을 권고하고 있다.
9. 본 시험법을 처음으로 확립하는 실험실은 부록 2에서 제시되는 숙련도를 입증하여야 한다. 유해물질의 규제를 위한 분류를 위해 BCOP 시험법 자료 제출 전에 부록 2의 화학물질을 사용하여 기술적 능력을 입증할 수 있다.

## IV. 시험의 원리

1. 본 BCOP 시험법은 *in vitro* 소각막의 정상적인 생리학적 및 생화학적 기능을 단기간 유지하여 적용하는 조직모델(*organotypic model*)이다. 이 시험에서 시험물질에 의한 손상은 *opacitometer*와 분광광도계를 이용하여 각막의 혼탁도와 투과도를 정량적으로 측정할 수 있다. 두 측정값은 시험물질의 *in vivo* 안자극 가능성 예측에 대한 *in vitro* 자극 유해성 분류 범주를 정하는 IVIS 산출을 위해 사용된다.

2. 본 BCOP 시험법은 갓 도축된 소에서 분리된 눈의 각막을 사용한다. 각막의 혼탁도는 각막을 통과하는 빛의 양을 정량적으로 측정하여 나타낼 수 있다. 투과도는 각막을 통과하여 후방 챔버의 배지로 이동한 플루오레세이나트륨의 양을 정량적으로 측정하여 나타낼 수 있다. 시험물질을 각막 홀더의 전방 챔버에 주입함으로써 각막 상피세포의 표면에 노출시킨다. 본 BCOP 시험법에서 사용되는 각막 홀더의 설명 및 그림은 부록 3에 수록되어 있다. 각막 홀더는 상품화된 다양한 제품을 구입하거나 또는 제작할 수 있다.

### 3. 소의 눈 출처, 나이, 동물 종 선택

○ 도축장의 소는 식용 및 다른 상업적 용도를 위해 도축된다. 식재료로 적합한 건강한 소에서 나온 각막을 BCOP 시험법에 사용한다. 소는 종, 나이, 성별에 따라 광범위한 체중을 가지므로, 도축 당시 추천되는 체중은 없다.

○ 각막의 지름은 동물의 연령에 따라 다를 수 있다. 8년령 이상 소의 경우, 각막의 수평 기준 지름(*horizontal diameter*)은 30.5 mm 이상이고, 각막의 중심 두께(*central corneal thickness, CCT*)는 1100  $\mu\text{m}$  이상이다<sup>(14)</sup>. 5년령 이하 소의 경우, 수평기준 지름은 28.5 mm 이하고, CCT는 900  $\mu\text{m}$  이하다<sup>(14)</sup>. 이런 이유로 60개월령 이상 소에서 추출한 눈은 사용하지 않는다. 12개월령 이하의 소에서 추출한 눈도 통상적으로 사용하지 않는데, 이는 눈이 발달하는 중에 있고 각막의 두께와 지름이 성우(成牛)보다 작다고 보고되어 있기 때문이다. 그러나 어린 동물(6~12개월령)의 각막은 쉽게 구할 수 있고, 좁은 나이 범위를 가지며, 작업자의 광우병 노출 가능성 감소라는 이점으로 인해 시험에 허용될 수 있다<sup>(15)</sup>. 각막의 크기 또는 두께에 따른 부식성 및 자극성 물질의 반응에 대한 평가를 위해 실험에 사용되는 소의 추정나이와 몸무게 기록을 권장한다.

#### 4. 눈의 수집과 운반

- 눈은 도축장 작업자에 의해 적출된다. 눈의 기계적 손상과 기타 손상을 최소화하기 위하여 도축 후 최대한 빨리 적출하고 운송하는 동안 차갑게 보관되어야 한다. 눈이 자극성이 있는 물질에 노출되는 것을 막기 위하여 도축장의 직원들은 동물의 머리를 세척할 때 세제를 사용하지 않는다.
- 눈의 변질 및 세균 오염을 최소화하기 위해 적절한 크기의 상자를 이용하여 차가운 HBSS(Hank's Balanced Salt Solution)에 완전히 담근 채로 운반한다. 눈은 도축과정 중에 수집이 되므로 혈액이나 세균 및 미생물들을 포함한 다른 생물학적 물질에 노출될 수 있다. 따라서 오염을 최소화 하는 것이 매우 중요하다. 이를 위해 눈을 담은 상자를 얼음상자에 넣고 HBSS에 100 IU/mL의 페니실린(penicillin)과 100  $\mu$ g/mL의 스트렙토마이신(streptomycin)을 첨가한다.
- 눈의 적출과 각막 사용 시점 사이의 시간 간격을 최소화하여야 한다. 보통 같은 날 수집하여 사용한다. 이 간격이 시험결과에 영향을 미치지 않았음을 입증하여야 한다. 시험결과는 눈의 선별기준과 양성 및 음성 대조군의 반응에 근거를 둔다. 한 시험에 쓰이는 모든 눈은 같은 날 수집되어야 한다.

#### 5. 눈의 선별 기준

- 실험실에 눈이 도착하면 혼탁도의 증가 여부, 굽힘, 신생혈관생성 등을 주의 깊게 검사한다. 이와 같은 결함이 없는 각막만 사용한다.
- 각막의 품질은 시험의 후반부에서 평가된다. 각막 홀더에서 1시간의 적응기를 거친 후, opacitometer를 이용하여 혼탁도가 7 이상을 나타낸 각막은 제외한다(교정된 opacitometer 사용, 부록 3 참고).
- 각 군(시험물질처리군, 음성대조군, 양성대조군)은 최소 3개의 눈을 사용한다. 음성대조군은 3개의 각막을 사용한다. 모든 각막은 안구에서 적출하여 각막 챔버에 고정되므로, 각각의 각막을 다루는 과정에서 혼탁도와 투과도의 오류가 발생할 수 있다. 따라서 IVIS 계산 시, 음성대조군에서 얻은 혼탁도와 투과도는 시험물질처리군 및

양성대조군의 투과도와 혼탁도 보정을 위해 사용된다.

## V. 시험절차

### 1. 눈 준비

- 손상이 없는 각막을 상피와 내피 손상에 주의하며 2~3 mm의 공막 가장자리를 포함하여 잘라낸다. 분리한 각막을 전방 챔버에는 각막의 상피가, 후방 챔버에는 각막의 내피가 위치하도록 각막 홀더에 장착한다. 양쪽 챔버에 미리 데워진 페놀 레드 (phenol red) 불포함 Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)을 후방부터 거품이 생기지 않도록 주의하며 먼저 채운다. 각막이 배지에 적응하여 정상 대사 활동을 할 수 있도록 각막 홀더를  $32 \pm 1$  °C로 최소 1시간동안 유지한다(참고 : 생체에서 각막 표면은 대략 32 °C이다).
- 적응기 이후, 미리 32 °C로 맞춰진 새 EMEM을 양쪽 챔버에 채워 혼탁도의 기준 값을 측정한다. 육안적 조직 손상(굴힘, 색소침착, 신생혈관형성)이나 혼탁도 7 이상의 각막은 버린다. 최소 3개의 각막을 음성(또는 용매)대조군으로 사용한다. 남은 각막들은 시험물질처리군과 양성대조군으로 사용한다.
- 물은 공기보다 비열이 크기 때문에, 배양에 필요한 온도를 더 안정적으로 제공한다. 따라서 온도 유지를 위해  $32 \pm 1$  °C로 유지된 수조를 사용하는 것이 좋다. 그러나 공기 배양기도 사용가능하며, 이 때 안정적 온도를 유지하는데 주의를 기울인다(예, 미리 홀더 및 배지의 온도를  $32 \pm 1$  °C로 조정).

### 2. 시험물질의 적용

- 액체 및 계면활성제(고체 또는 액체)에 해당되는 프로토콜과 계면활성제 불포함 고체에 대한 프로토콜, 두가지 프로토콜이 있다.
- 액체, 반고형제, 크림, 왁스 및 계면활성제(고체 또는 액체) : 액체, 반고체, 크림 및 왁스는 희석하지 않고 적용하며, 계면활성제는 0.9% 염화나트륨용액이나 증류수 또는 시험에 영향을 미치지 않는 용매에 10 %w/v 농도로 희석하여 적용한다. 계면활성제 포함 혼합물은 희석하지 않고 적용하거나 체내 노출 상황을 고려하여 적절한 농도로 희

석시켜 적용한다. 각막의 시험물질 노출시간은 10분이다. 희석농도 및 적용시간을 다르게 할 경우 이에 대한 충분한 과학적 근거를 확보하여야 한다. 용어정의를 참고하여 계면활성제와 계면활성제 포함 혼합물에 대한 정의를 알 수 있다.

- 계면활성제 불포함 고체 : 일반적으로 0.9% 염화나트륨용액이나 증류수 혹은 시험에 영향을 미치지 않는 용매에 20 %w/v 농도로 희석한 용액이나 현탁액 상태로 적용한다. 과학적 타당성이 있는 경우 고체는 개방형 챔버를 이용하여 직접 적용할 수 있다. 각막의 시험물질 노출시간은 4시간이다. 적용시간을 다르게 할 경우 이에 대한 충분한 과학적 근거가 있어야 한다.

○ 고체, 액체, 점성을 띠는 액체 또는 띠지 않는 액체 분류처럼, 시험물질의 본연의 성질과 화학적 성질에 따라 다른 적용 방법이 사용될 수 있다. 중요한 사항은 시험물질이 각막 표면을 적절하게 잘 덮고 있는지와 세척 과정에서 시험물질을 충분히 잘 제거했는지를 확인하는 것이다.

- 폐쇄형 챔버법 : 일반적으로 점성이 없거나 약간 점성이 있는 액체물질 적용 시 사용된다. 전방 챔버의 구멍을 통해 전체 각막 상피의 표면을 덮을 수 있는 충분한 양(약 750  $\mu$ L)의 실험물질이 투여되고, 적용시간 동안 구멍은 마개를 이용하여 막아둔다. 시험물질을 규정된 시간만큼 충분하게 적용한다.

- 개방형 챔버법 : 일반적으로 반점성에서 점성의 액체와 고체 적용 시 사용된다. 실험 전에 전방 챔버의 잠금쇠 링과 유리를 제거한다. 마이크로피펫을 이용하여 대조물질이나 시험물질(750  $\mu$ L, 또는 각막을 덮을 수 있는 충분한 양)을 각막 상피표면에 직접 적용한다. 피펫으로 적용이 어려운 물질의 경우, 포지티브 디스플ACEMENT 피펫 (positive displacement pipet)으로 적용할 수 있다. 시험물질을 취할 때 공기방울이 혼입되지 않도록 주의한다. 필요하면 주사바늘을 제거한 주사기를 사용할 수 있다. 적용 후 챔버에 유리를 장착하여 밀폐한다.

### 3. 적용 후 배양

- 적용 후, 시험물질, 음성대조물질 또는 양성대조물질을 전방 챔버에서 제거하고, 각



막 상피를 최소 3번(또는 육안으로 적용물질이 관찰되지 않을 때까지) 페놀레드가 포함된 EMEM으로 세척한다. 페놀레드의 색변화로 산성 또는 염기성 물질 제거 여부를 확인할 수 있다. 페놀레드의 색깔이 노란색 또는 보라색으로 변하거나, 적용물질이 여전히 보인다면 각막을 세 번 이상 세척한다. 적용물질이 배지에 남아있지 않다고 판단되면 마지막으로 페놀레드가 포함되지 않은 EMEM으로 각막을 세척한다. 페놀레드가 포함되지 않은 EMEM은 혼탁도 측정 전에 전방 챔버의 페놀레드를 제거하기 위해 마지막 세척과정에 사용한다. 마지막 세척 후 전방 챔버를 페놀레드가 없는 EMEM으로 다시 채운다.

- 액체나 계면활성제의 경우 세척 후 각막을 2시간 동안  $32 \pm 1$  °C에서 추가 배양한다. 경우에 따라서는 배양 시간이 더 길수록 유익할 수 있으므로 상황에 따라 적절한 시간동안 배양한다. 고체를 적용한 각막은 4시간 적용 후, 완전히 세척하며, 추가 배양은 하지 않는다.
- 액체와 계면활성제의 추가 배양 후에, 그리고 계면활성제 불포함 고체는 4시간 적용 후에 혼탁도와 투과도를 측정한다. 이때 각 각막을 육안으로 관찰하고 관찰 사항을 기록한다(예, 조직의 벗겨짐, 잔여 시험물질, 균질하지 않은 혼탁도). 이런 관찰사항은 opacitometer의 측정값에 영향을 줄 수 있기 때문에 중요하다.

#### 4. 대조물질

- 모든 시험은 음성대조군 혹은 용제·용매대조군과 양성대조군을 포함해서 시험한다.
- 음성대조군: 100% 액체물질을 시험할 경우, 0.9% 염화나트륨 용액 또는 증류수의 음성대조군을 포함시킨다. 이를 통해 시험의 비특정 변화를 감지할 수 있으며, 평가항목에 대한 기준치를 제공한다. 또한 이를 통해 시험 결과값이 실험조건 이상에 따라 발생된 것이 아니라는 것을 알 수 있다.
- 용제·용매대조군: 희석된 액체, 계면활성제 또는 고체물질을 시험할 경우, 용제·용매대조군을 포함시킨다. 이를 통해 시험의 비특정 변화를 감지할 수 있으며, 평가항목에 대한 기준치를 제공한다. 시험에 영향을 주지 않는 용매를 사용한다.

- 양성대조군 : 양성반응을 유발하는 물질을 양성대조군으로 사용함으로써 시험계의 이상이 없음을과 정확한 시험 수행 여부를 확인할 수 있다. 양성대조물질의 자극 정도는 적용시간에 따라 나타나는 반응의 차이를 가늠할 수 있는 정도가 적절하며 이를 넘어선 지나친 자극을 나타내는 경우 양성대조물질로 사용하기에 적합하지 않다. 액체 시험물질의 양성대조물질로는 100% 에탄올 또는 100% 디메틸포름아미드를 사용한다. 고체 시험물질의 양성대조군으로는 이미다졸을 0.9% 염화나트륨용액에 녹여 20 %w/v로 한 액을 사용한다.
- 기준 물질 : 잘 알려지지 않은 물질에 대한 눈의 자극성을 평가하거나, 특정 자극 범위에서의 상대적인 눈의 자극성을 평가할 때에는 기준 물질이 유용할 수 있다.

## 5. 평가항목 측정

- 혼탁도 : 각막을 통과하는 빛의 양으로 결정된다. 각막 혼탁도는 opacitometer를 이용하여 정량적으로 측정한다.
- 투과도 : 플루오레세이나트륨이 각막의 전 세포층을 통과하는 양으로 결정된다. 세포층은 바깥쪽의 각막 표면에서부터 안쪽의 각막 표면을 일컫는다. 시험물질이 액체 또는 계면활성제인 경우에는 4 mg/mL의 플루오레세이나트륨용액을, 계면활성제 불포함 고체인 경우에는 5 mg/mL의 플루오레세이나트륨용액을 사용한다. 플루오레세이나트륨용액 1 mL를 각막의 상피조직이 놓이는 전방 챔버에 넣고, 각막의 내피조직이 놓이는 후방 챔버에는 EMEM을 채운다. 홀더를 수평하게 놓고 90 ± 5분 동안 32 ± 1 °C에서 배양한다. 배양 후 후방 챔버로 이동한 플루오레세이나트륨용액을 분광광도계로 측정(측정과장: 490 nm)한다. 투과도는 층장 1 cm 값인 OD<sub>490</sub>으로 나타낸다. 대체법으로는 96-well microtiter plate reader를 사용 할 수 있다. 측정의 정확성을 위해 well을 가득(약 360 μL) 채워야 하며, 측정값은 검량선 범위 내에 있어야 한다. 측정값은 층장 1 cm 값인 OD<sub>490</sub>으로 환산하여 나타낸다.

## VI. 자료와 보고

## 1. 자료평가

- 공시험의 혼탁도와 음성대조군 투과도로 교정한 혼탁도와 평균 투과도(OD<sub>490</sub>)를 다음 식에 대입하여 안점막자극지수(IVIS)를 산출한다.

$$IVIS = \text{평균 혼탁도} + (15 \times \text{평균 투과도 OD}_{490})$$

- Sina 외<sup>(16)</sup>는 위의 계산식이 실험실내 및 실험실간 실험에서 얻어진 것이라고 보고했다. In vivo 자료와 in vitro 자료간 최적의 수식을 결정하기 위해 여러 실험실 참여 연구에서 생성된 36개의 화합물에 대한 자료에 대해 다변량분석을 실시하였다. 다른 2곳 회사의 소속 과학자들이 이러한 분석을 실시하였고 서로 거의 동일한 수식을 얻었다.
- 시험물질의 부식 또는 심한 자극의 유발 여부를 알아보기 위해 혼탁도와 투과도를 개별적으로 평가하여야한다.

## 2. 결정 기준

- 심한 안손상을 유발하는(UN GHS Category 1) 시험물질과 안자극 또는 심한 안손상을 유발하지 않는(UN GHS No Category) 시험물질의 판별을 위한 안점막자극지수의 기준값은 다음과 같다.

안점막자극지수(IVIS)	UN GHS
≤3	미분류
>3 및 ≤55	예측할 수 없음
>55	Category 1

## 3. 시험의 타당성 기준

- 양성대조군 안점막자극지수가 누적된 결과의 평균값 ± 2×표준편차 범위 안에 있을

때 시험은 적합하다. 본 시험법을 규칙적으로 사용하는 실험실의 경우 최소 3개월마다 확인한다. 시험을 한 달에 한번 미만으로 수행하는 것과 같이 규칙적으로 수행하지 않는 경우 매회 양성대조군의 안점막자극지수를 확인한다. 음성 또는 용매대조군의 반응은 음성대조물질 또는 용매를 소의 각막에 처리하여 얻은 기존의 혼탁도와 투과도의 상한값을 초과하지 않아야 한다. 물질 분류에 대한 결과가 분명하면, 한 물질마다 최소 3개의 각막을 사용하는 단회 시험으로 충분하나, 첫번째 시험에서 경계치의 결과가 나오는 경우 두번째 시험을 고려해야 한다. 또한, 첫번째와 두번째 시험에서의 평균 안점막자극지수 결과가 일치하지 않는 경우 세번째 시험을 고려해야 한다. 이러한 맥락에서 첫번째 실험 3개의 각막에서 결과가 일치하지 않는 경우를 경계치의 결과로 간주한다. 다음과 같은 경우를 일치하지 않는다고 본다.

- 3개 각막 평균에서 3개 각막 중 2개의 예측결과가 불일치인 경우, 또는
- 3개 각막 평균에서 3개 각막 중 1개의 예측결과가 불일치인 경우, 그리고 이 불일치의 값이 안점막자극지수 기준 한계치 값 55에서 10이 초과된 경우
- 반복시험 예측결과가 첫번째 예측결과(평균 안점막자극지수 값 기준)와 일치하면, 추가시험 없이 최종 결정을 내릴 수 있다. 만약 반복시험 예측결과가 첫번째 예측결과와 일치하지 않으면, 불확실한 예측결과 해결하기 위해 세번째 최종 시험을 수행하여 시험물질을 분류한다. 위의 어느 하나의 시험에서라도 UN GHS 분류 1로 예측될 경우, 더 이상 추가 시험을 진행하지 않아도 된다.

## VII. 결과보고

- 시험보고서는 시험 수행과 관련하여 다음의 정보를 포함하여야 한다.
- 시험물질과 대조군 물질
  - 일반명 등 명칭, CAS 번호, CAS 등록번호(있을 경우)
  - 순도 또는 조성(%)
  - 이화학적 성질(물성, 휘발성, pH, 안정성, 화학적 분류, 용해도 등)
  - 시험 전 시험/대조 물질 처리방법(예, 가온, 분쇄)
  - 알려져 있는 안정성 정보
- 시험의뢰자와 시험장소 정보
  - 시험의뢰자, 시험장소, 시험책임자의 이름과 주소
- 시험법 조건
  - 사용한 opacitometer의 정보(예, 모델명, 설명서)
  - opacitometer 및 분광광도계 검·교정 정보
  - 각막 홀더의 종류(예, 모델명, 설명서)
  - 그 외 사용한 기구에 대한 설명
  - 시험법의 정확도와 신뢰성을 보증하는 데 사용되는 절차(예, 기지 물질을 이용한 주기적 실험)
- 적합기준
  - 축적된 자료를 근거로 한 양성과 음성 대조군의 적합범위
  - 가능하다면, 축적된 자료를 근거로 하는 대조 기준물질 적합범위
- 안구 수집 및 준비
  - 소안구 출처 증명(예, 적출 시설)
  - 사용된 소의 나이 추정 및 실험 사용의 적합성을 위한 각막 지름 값
  - 소안구 보관 및 운송 상태(예, 안구 수집 날짜와 시간, 안구 수집과 시험 시작 전 시간 간격, 수송용 배지와 온도, 사용된 항생제)
  - 각막의 품질, 각막홀더 온도, 각막선정기준에 대한 증명서

○ 시험 절차

- 시험을 반복한 횟수
- 사용된 음성 및 양성 대조군의 정보(가능하다면 용제와 기준물질도 포함)
- 시험물질 농도, 적용, 노출 시간, 후배양 시간
- 결과의 평가와 평가기준에 대한 설명
- 시험의 타당성 기준에 대한 설명
- 시험절차 수정 시 이에 대한 기록 및 설명
- 결정기준에 대한 설명

○ 결과

- 각 군별 도출 결과값을 도표화(예, 실험물질과 양성 및 음성 대조군, 기준 물질의 혼탁도와 OD<sub>490</sub> 및 계산된 안점막자극지수 값, 반복 실험 결과와 각 실험별 평균 ± 표준편차)
- 관찰된 다른 결과에 대한에 대한 설명

○ 고찰

○ 결론

## VIII. 맺음말

본 가이드라인을 통해 과학적이고 표준화된 동물대체시험법을 제시함으로써 화장품업계 및 독성시험 기관의 국제 경쟁력을 향상시키는데 도움이 되길 바란다.

## IX. 용어정의

- 1. 정확성(Accuracy)** : 시험결과와 참고치의 일치 정도. 시험 수행에 대한 평가 척도이고 상관성(relevance)의 한 측면이다. 정확성은 정확하게 맞춘 시험결과의 비율을 의미하는 “일치성(concordance)”과 같은 의미로 쓰인다.
- 2. 기준물질(Benchmark substance)** : 이 물질은 시험물질의 비교 기준으로 사용한다. 기준물질로 갖춰야 할 속성은 다음과 같다. (i) 반응의 일관성 (ii) 구조적, 기능적 유사성 (iii) 물리·화학적 특성 (iv) 효과 입증 자료 (v) 충분한 효력
- 3. 상향식 접근방식(Bottom-up approach)** : 안자극 또는 심한 안손상을 유발하지 않는 화학물질에 대한 단계적 접근. 이 접근방법은 대상 화학물질에서 분류를 필요로 하지 않는 물질(음성반응)을 결정하는 것으로부터 시작된다.
- 4. 각막(Cornea)** : 홍채와 동공을 덮고 있고, 빛을 통과시키는 안구 앞면의 투명한 부분
- 5. 각막혼탁도(Corneal opacity)** : 시험물질에 의한 각막의 불투명정도. 각막 혼탁도 증가는 각막 손상정도를 나타낸다. 각막 혼탁도는 Draize 시험법처럼 주관적으로 평가하거나, opacitometer와 같은 기구를 이용하여 객관적으로 측정할 수 있다.
- 6. 각막투과도(Corneal permeability)** : 각막 상피의 손상을 정량적으로 측정할 수 있는 지표로 각막층을 통과하는 플루오레세이나트륨 양을 측정함으로써 산출할 수 있다.
- 7. 안자극(Eye irritation)** : 안구 앞면에 시험물질 적용 후 나타나는 변화로서 물질적용 후 21일 이내 회복이 된다. “눈에 미치는 가역적 영향” 과 “GHS Category 2” 와 같은 의미로 사용된다<sup>(4)</sup>.
- 8. 위음성률(False negative rate)** : 음성으로 판정되는 모든 양성물질의 비율
- 9. 위양성률(False positive rate)** : 양성으로 판정되는 모든 음성물질의 비율
- 10. 유해성(Hazard)** : 물질이 생명체, 생태계 또는 특정 인구집단에 노출될 때, 위해영향을 야기할 가능성이 있는 물질 또는 상황(situation)의 본질적 특성
- 11. 안점막자극지수(In Vitro Irritancy Score, IVIS)** : BCOP 시험에 사용되는 공식. 각 처치군에서 산출된 평균 혼탁도와 투과도 값은 이 공식에 의하여 하나의 in vitro 점수로 산출된다.  $IVIS = \text{평균 혼탁도} + (15 \times \text{평균 투과도})$
- 12. 눈에 미치는 비가역적인 영향(Irreversible effects on the eye)** : “심한 안손상”항 참고

13. **복합물질(Mixture)** : 서로 반응하지 않는 2가지 이상의 물질로 구성된 복합물질 또는 용액<sup>(4)</sup>
14. **음성대조군(Negative control)** : 시험의 모든 구성요소를 포함하고 실시되는 비처리군. 용매가 시험에 미치는 영향을 알아보기 위해 사용된다.
15. **미분류(Not classified)** : 안자극(UN GHS Category 2, 2A, 또는 2B) 또는 심한 안손상(UN GHS Category 1)으로 분류되지 않은 화학물질. “UN GHS No Category” 의미와 바꾸어 사용할 수 있다.
16. **Opacimeter** : 각막을 투과하는 빛의 정도를 측정함으로써 “각막의 불투명도”를 측정하는데 사용하는 기구
17. **양성대조군(Positive control)** : 시험의 모든 구성요소를 포함하고 양성 반응을 유도한다고 알려진 물질로 처리한 군. 시간에 따른 반응 정도를 평가하기 위해 사용한다.
18. **눈에 미치는 가역적 영향(Reversible effects on the eye)** : “안자극”항 참고
19. **신뢰성(Reliability)** : 동일한 시험방법으로 반복하여 시행하였을 때 동일 실험실과 다른 실험실에서 시험 결과를 재현할 수 있는 정도. 신뢰성은 실험실 내, 실험실 간 재현성(reproducibility)으로 평가된다.
20. **심한 안손상(Serious eye damage)** : 안구 앞면에 시험물질 적용 후 21일 이내에 회복되지 않는 안조직 손상 또는 시력의 심각한 시력 손상으로, “눈에 미치는 비가역적 영향”과 “UN GHS Category 1”<sup>(4)</sup> 의미와 바꾸어 사용할 수 있다.
21. **용제·용매 대조군(Solvent/vehicle control)** : 용매·부형제 등 시험계의 모든 요소를 포함하지만 시험물질은 처리하지 않는 군. 용매·부형제에 녹여진 시험물질로 처리한 군의 기본적인 반응을 평가하기 위해 사용된다. 음성대조군으로 동시 사용될 때, 용매·부형제에 대한 시험계와의 반응여부를 보여준다.
22. **단일물질(Substance)** : 생산과정을 통해 얻어지거나 또는 자연상태로 얻는 화학 원소들(elements)과 이들의 화합물(compound). 생산물의 안정성을 유지시키는데 필요한 모든 첨가제와 생산 과정에서 유래하는 모든 불순물을 포함한다. 그러나 해당물질의 안정성이나 그 조성의 변화에 영향을 주지 않고 분리 될 수 있는 용매는 제외한다<sup>(4)</sup>.
23. **계면활성제(Surfactant)** : 세척제로 알려진 물질로서 액체의 표면 장력을 낮추어 거품 생성 또는 고체가 통과할 수 있도록 한다.
24. **계면활성제 포함 혼합물(Surfactant-containing mixture)** : 본 지침서에서는, 총 >5%의 농도로 하나 이상의 계면활성제를 포함한 혼합물을 지칭한다.



25. **하향식 접근방식(Top-down approach)** : 심한 안손상을 유발할 것으로 추정되는 화학물질에 대한 단계적 접근법. 이 접근방법은 심한 안손상을 유발하는 화학물질(양성 반응)을 결정하는 것으로부터 시작된다.
26. **시험물질(Test chemical)** : 시험법에서 평가되는 화학물질(단일물질 또는 복합물질).
27. **단계적 시험전략(Tiered testing strategy)** : 시험물질에 대한 기존의 모든 정보를 특정 순서에 따라 검토하는 단계적인 시험전략. 다음 단계로 진행하기 전에 위험 분류를 결정하기 위한 충분한 정보가 있는가를 각 단계별로 가중치를 두어 검토한다. 예를 들어 시험물질의 자극 가능성에 대한 결정이 기존 자료를 근거로 이루어진다면 추가적인 시험이 필요하지는 않다. 시험물질의 자극 가능성에 대한 분류를 기존 자료를 근거로 결정할 수 없으면, 통일된 결론을 얻을 때까지 일련의 동물시험이 수행되어야 한다.
28. **UN GHS (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals)** : 물리적, 보건적, 환경적 위험성의 수준 및 표준화된 유형에 따른 화학물질(단일물질 또는 복합물질)의 분류체계로, pictogram, 표시방법, 위해에 대한 사항, 사전주의 사항, 안전정보지 등의 소통 방식을 통해 화학물질의 유해 정보를 전달하여, 사람(고용주, 근로자, 운송자, 소비자, 응급처치자 등)과 환경을 보호하고자 제시된 체계이다.
29. **UN GHS Category 1** : “심한 안손상”항 참고
30. **UN GHS Category 2** : “안자극”항 참고
31. **UN GHS No Category** : UN GHS Category 1 또는 2(2A 또는 2B)로 분류되지 않는 화학물질. “Not Classified”로 바꾸어 사용할 수 있다.
32. **검증된 시험법(Validated test method)** : 특정한 목적에 대한 신뢰성과 적절성(정확성 포함)을 평가하기 위한 검증연구를 마친 시험법
33. **증거의 가중치(Weight-of-evidence)** : 시험물질의 잠재적인 유해성에 관한 결론에 도달하기 위해 활용되는 다양한 정보들의 확실성과 취약성을 고려하는 과정

## X. 참고문헌

1. ICCVAM (2006). Test Method Evaluation Report - In Vitro Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Available:  
[[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\\_tmter.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmter.htm)].
2. ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report: Current Validation Status of In Vitro Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. NIH Publication No.10-7553. Research Triangle Park, NC:National Institute of Environmental Health Sciences. Available:  
[<http://iccvamniehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm>].
3. OECD (2013). Streamlined Summary Document supporting the Test Guideline 437 for eye irritation/corrosion. Series on Testing and Assessment, No.189, OECD, Paris.
4. UN (2011). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30 Rev 4, New York and Geneva: United Nations. Available:  
[[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev04/04files\\_e.html](http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html)].
5. Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., and Zuang, V. (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.
6. ICCVAM (2006). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report - In Vitro Ocular Toxicity Test Methods for

Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Available: [[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\\_tmmer.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmmer.htm)].

7. ICCVAM (2010). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report - Current Validation Status of In Vitro Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 10-7553A. Available: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm>].

8. INVITTOX (1999). Protocol 124: Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay - SOP of Microbiological Associates Ltd. Ispra, Italy: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM).

9. Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D. and Sina, J.F. (1992). Bovine corneal opacity and permeability test: An in vitro assay of ocular irritancy. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18:442-449.

10. Prinsen, M.K. (2006). The Draize Eye Test and in vitro alternatives; a left-handed marriage? *Toxicol. in Vitro* 20:78-81.

11. Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Available: [<http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf>].

12. Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester, J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.

13. OECD (2011). Guidance Document on The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-severe Irritants. Series on Testing and Assessment, No. 160. Adopted October 25, 2011. Paris:Organisation for Economic Co-operation and Development.
14. Doughty, M.J., Petrou, S. and Macmillan, H. (1995). Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse. *Can. J. Zool.* 73:2159-2165.
15. Collee, J. and Bradley, R. (1997). BSE: A decade on - Part I. *The Lancet* 349: 636-641.
16. Sina, J.F., Galer, D.M., Sussman, R.S., Gautheron, P.D., Sargent, E.V., Leong, B., Shah, P.V., Curren, R.D., and Miller, K. (1995). A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates. *Fundam. Appl. Toxicol.* 26:20-31.
17. OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Available:  
[[http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en\\_2649\\_34377\\_37051368\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html)].
18. ICCVAM (2006). Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method. NIH Publication No.: 06-4512. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Available:  
[[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\\_brd\\_bcop.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm)].
19. OECD (1998). Series on Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring. No. 1 : OECD Principles on Good Laboratory Practice (revised in 1997). ENV/MC/CHEM(98)17. Available :  
[[http://www.oecd.org/document/63/0,3343,en\\_2649\\_34381\\_2346175\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/63/0,3343,en_2649_34381_2346175_1_1_1_1,00.html)]

부록 1. BCOP 시험법 예측 능력

표 1. 심한 안손상을 유발하는 화학물질 구별에 대한 BCOP 예측 능력 [UN GHS/ EU CLP Cat 1 vs Not Cat 1 (Cat2 + No Cat); US EPA Cat 1 vs Not Cat (CatII + CatIII + Cat IV)]

분류체계	물질 (수)	정확성		민감도		위음성		특이도		위양성	
		%	수	%	수	%	수	%	수	%	수
UN GHS EU CLP	191	78.53	150/191	86.15	56/65	13.85	9/65	74.60	94/126	25.40	32/126
US EPA	190	78.95	150/190	85.71	54/63	14.29	9/63	75.59	96/127	24.41	31/127

표 2. 안자극 또는 심한 안손상으로 분류되지 않는 화학물질(비자극) 구별에 대한 BCOP 예측 능력[UN GHS/EU CLP No Cat vs Not No Cat (Cat 1 + Cat 2); US EPA Cat IV vs Not Cat IV (Cat I + Cat II + Cat III)]

분류체계	물질 (수)	정확성		민감도		위음성		특이도		위양성	
		%	수	%	수	%	수	%	수	%	수
UN GHS EU CLP	196	68.88	135/196	100	107/107	0	0/107	31.46	28/89	68.54	61/89
US EPA	190	82.11	156/190	93.15	136/146	6.85	10/146	45.45	20/44	54.55	24/44

## 부록 2. BCOP 시험법 숙련을 위한 시험물질

BCOP 시험을 시작하기에 앞서 표 1의 13개 물질에 대한 눈의 유해성 분류를 정확하게 판별하여 숙련도를 입증해야 한다. 이 물질들은 토끼를 이용한 안점막시험(TG 405)<sup>(17)</sup> 결과와 UN GHS 분류 체계(Categories 1, 2A, 2B, 또는 Not Classified)<sup>(4)</sup>를 기반으로 눈에 대한 유해성 반응범위를 나타내기 위하여 선정되었다 (TG 405)<sup>(17)</sup>. 상업적으로 얻을 수 있는 가능성, in vivo 자료 유무, BCOP 시험법에서 얻은 in vitro 자료의 유무에 따라 선정하였다. '요약정리문서'<sup>(3)</sup>와 'ICCVAM의 BCOP 시험법 근거 자료문서'<sup>(2)(18)</sup>를 참고할 수 있다.

표 1. BCOP 시험법 숙련을 위한 실험물질

Chemical	CASRN	Chemical Class <sup>1</sup>	Physical Form	In Vivo Classification <sup>2</sup>	BCOP Classification
Benzalkonium chloride (5%)	8001-54-5	Onium compound	Liquid	Category 1	Category 1
Chlorhexidine	55-56-1	Amine, Amidine	Solid	Category 1	Category 1
Dibenzoyl-L-trtartaric acid	2743-38-6	Carboxylic acid, Ester	Solid	Category 1	Category 1
Imidazole	288-32-4	Heterocyclic	Solid	Category 1	Category 1
Trichloroacetic acid (30%)	76-03-9	Carboxylic acid	Liquid	Category 1	Category 1
2,6-Dichlorobenzoyl chloride	4659-45-4	Acyl halide	Liquid	Category 2A	No accurate/reliable prediction
Ethyl-2methylacetate	609-14-3	Ketone, Ester	Liquid	Category 2B	No accurate/reliable prediction
Ammonium nitrate	6484-52-2	Inorganic salt	Solid	Category 2 <sup>3</sup>	No accurate/reliable prediction
EDTA, di-potassium salt	25102-12-9	Amine, Carboxylic acid (salt)	Solid	Not Classified	Not Classified
Tween 20	9005-64-5	Ester, Polyether	Liquid	Not Classified	Not Classified
2-Mercaptopyrimidine	1450-85-7	Acyl halide	Solid	Not Classified	Not Classified
Phenylbutazone	50-33-9	Heterocyclic	Solid	Not Classified	Not Classified
Polyoxyethylene 23 lauryl ether(BRIJ-35) (10%)	9002-92-0	Alcohol	Liquid	Not Classified	Not Classified

※ 약어: CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number

<sup>1</sup> Chemical classes were assigned to each test substance using a standard classification scheme, based on the National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH) classification system (available at <http://www.nlm.nih.gov/mesh>)

<sup>2</sup>Based on results from the *in vivo* rabbit eye test (OECD TG 405)<sup>(17)</sup> and using the UN GHS.

<sup>3</sup>Classification 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 conjunctiva 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 conjunctiva redness score of 1 (at day 7) that fully recovered at day 10.

## 부록 3. 장치

### 3-1. BCOP 각막 홀더

재질은 불활성물질이어야 한다(예, 폴리프로필렌). 홀더는 전·후방 챔버로 구성된다. 각 챔버는 용량이 5 mL이고, 내경 1.7 cm와 깊이 2.2 cm이다<sup>1)</sup>. O-링은 후방 챔버에 위치하여 누수를 막는 역할을 한다. 각막의 내피가 후방 챔버의 O-링과 맞닿게 두고, 각막의 상피는 전방 챔버와 맞닿게 둔다. 챔버는 바깥 가장자리에 위치한 세 개의 스테인리스 나사에 의해 고정된다. 각 챔버의 끝의 유리창은 각막에 접근이 용이하게 하기 위해 쉽게 제거될 수 있다. 유리창과 챔버 사이에 누수 방지를 위해 O-링을 사용한다. 각 챔버의 상단에 두개의 구멍을 통하여 배지와 실험물질을 적용하거나 제거할 수 있다. 이 구멍들은 처치 및 배양 시간동안 고무마개로 닫아 놓는다. 챔버 안쪽 내경 또는 유리창의 파손 및 찢어짐 또는 화학물질 잔여물 축적이 빛을 분산 또는 굴절시켜 각막 홀더를 통한 빛의 투과량이 달라질 수 있다. 따라서 빛 투과 기준값(반대로는 혼탁도의 기준값)이 증가 또는 감소될 수 있으며 각 챔버의 예상되는 기준 초기 각막 혼탁도 측정값이 눈에 띄게 달라진다. 각 각막의 초기 각막 혼탁도 값은 예상 기준값보다 일반적으로 2 또는 3 이상의 혼탁도의 차이를 보인다. 실험실은 시험하는 화학물질의 고유성질 및 홀더의 사용 빈도수를 고려하여 각막 홀더의 빛 투과도 변화를 평가하는 프로그램을 만드는 것을 고려해야 한다. 기준값을 설정하기 위해 시험 실시전에 배지만 채운 챔버에서 기준 혼탁도 값을 측정하여 각막 홀더를 점검한다. 각막 홀더를 사용하는 동안의 빛의 투과도 변화를 주기적으로 점검한다. 실험실은 사용하는 화학물질, 홀더의 사용 빈도수, 각막 혼탁도 기준값의 변화를 기준으로 각막 홀더에 대한 주기적 점검 빈도를 정할 수 있다. 각막 홀더의 빛 투과에 눈에 띄는 변화가 관찰되었을 시, 각막 홀더 내부의 적절한 청소 및 연마가 필요하거나 홀더를 교체하는 것을 고려해야 한다.

---

1) 12~60개월령의 소를 기준으로 각막 홀더의 치수를 맞추었다. 6~12개월령의 소를 사용할 경우 각막 홀더의 각 챔버는 4 mL의 용량이 들어가도록 설계한다. 또한 각 챔버의 안쪽은 1.5 cm 지름과 2.2 cm 깊이를 가진다. 새롭게 설계되는 각막 홀더는 노출되는 각막의 표면면적과 전방 챔버의 용량의 비율이 기존의 각막 홀더의 비율과 같아야 한다. IVIS값 산출을 위해 투과도를 정확하게 정하는 것이 필요하다.



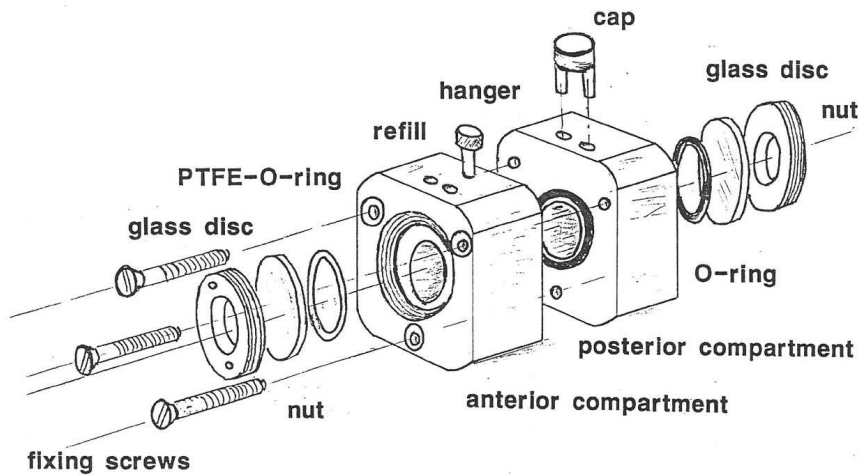


그림. BCOP 각막 홀더

### 3-2. OPACITOMETER

빛의 투과도를 측정하는 장치이다. Electro Design사(프랑스, 리움)의 OP-KIT 기구가 본 BCOP 시험법 검증에 사용되었다. 빛은 할로겐 램프에서 창 또는 빈 챔버를 통해 포토셀로 전송되며 이는 물질이 들어 있는 챔버를 통과한 빛과 비교된다. 포토셀에서 빛 전송에 차이가 비교되어 혼탁도 값이 표시된다. 다른 종류의 opacitometer를 사용할 수 있으며 이때 검증된 기구와 비슷한 결과를 얻을 수 있다는 증거를 제시해야 한다. opacitometer는 예측 모델에 의해 설명되는 여러 분류기준을 위해 사용된 기준값(부식성과 심한 자극을 결정하는 기준까지를 일컬음)이 포함된 혼탁도 범위에 대한 선형 반응을 제공해야 한다. 혼탁도 75~80 까지 선형적이며 정확한 값을 가질 수 있도록 일련의 교정기를 이용하여 opacitometer를 교정한다. 교정을 위해 교정기(폴리에스터 불투명 시트)를 교정 챔버(교정기를 끼울 수 있도록 제작된 각막 챔버)에 장착한 후 측정한다. 교정 챔버는 실제 각막이 놓이는 위치에 교정기를 장착할 수 있도록 설계되었다. 참고값과 초기설정 값은 사용하는 기구에 따라 달라질 수 있다. 사용하는 기구에 맞춰진 적절한 시험절차를 이용하여 선형의 혼탁도 측정값을 가질 수 있다. OP-KIT 기구는 교정기가 없는 교정 챔버를 이용하여 opacitometer를 혼탁도 0으로 먼저 교정한다. 교정 챔버에 세 개의 다른 교정기를 하나 씩 장착하여 혼탁도를 측정한다. 교정기 1, 2, 3은 설정된 혼탁도 75, 150, 225를 각각 나타내며, 그 허용 범위는  $\pm 5\%$  이내 이어야 한다.