

등록번호

안내서-0754-01

화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인 (VI) (민원인 안내서)

- 안점막자극시험 -

닭의 안구를 이용한 안점막자극시험법(ICE 시험법)
(Isolated Chicken Eye Test Methods)

2015. 5.



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

독성평가연구부 특수독성과

지침서·안내서 제·개정 점검표

명칭

화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인(VI) (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)		안 일 영 이 종 권

이 안내서는 화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인(VI)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 2015년 5월 21일 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	B1-2015-4-001	2015.5.21	화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인(VI) 제정
2	안내서-0754-01	-	「식약처 지침서등의 관리에 관한 규정」 개정에 따른 일괄 재분류 (규제개혁담당관실-3761호,2017.5.16)

목 차

I. 서론	1
II. 개요	2
III. 유의사항	4
IV. 시험의 원칙	6
V. 시험절차	7
VI. 자료와 보고	12
VII. 결과보고	14
VIII. 용어정의	17
IX. 참고문헌	21
부록 1. ICE 시험법 숙련을 위한 시험물질	24
부록 2. 장치	26

「화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인」(VI) 제정

I. 서론

1. 배경

화장품 안전성 평가에 있어 국제적으로 동물대체시험법의 요구가 증가하고 있으며, 유럽에서는 화장품 안전성 평가에 동물실험이 사용되는 것을 법으로 금지하고 있다. 또한 화장품 산업이 급속하게 과학화, 국제화가 추진되고 있어 화장품에 대한 과학적이고 효율적인 안전성 평가방법 가이드라인이 요구되고 있다. 이에 따라 화장품의 안전성 평가 시 사용할 수 있는 표준화된 동물대체시험법의 제정이 필요하게 되었다.

2. 목적

본 가이드라인이 토끼를 이용한 안점막자극시험의 완전한 동물대체시험법으로 활용될 수는 없으나, 닭각막의 혼탁 유발 및 투과성 증가를 측정하여 심한 안자극 및 비자극 물질을 판정할 수 있는 방법으로 활용될 수 있다. 본 가이드라인을 통해 과학적이고 표준화된 동물대체시험법을 제시함으로써 화장품업계의 화장품 개발에 편의를 제공하고 독성시험 기관의 국제 경쟁력을 향상시키는데 도움을 주고자 한다.

※ 본 가이드라인은 경제협력개발기구(OECD) 시험법 가이드라인 438번(Isolated Chicken Eye Test Method)에 근거하며 마련되었다.

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 Centre for the Validation of Alternative Methods: JaCVAM)의 협조 하에 적출된 닭 눈(Isolated Chicken Eye: ICE)을 이용한 시험법을 2006년과 2010년에 평가하였다⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾. 첫 번째 평가에서는 ICE 시험법이 UN GHS (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals)에 규정된 심한 안손상(Category 1)을 유발하는 화학물질(단일물질 및 복합물질)을 식별하기 위한 검색법으로서 과학적으로 타당하다는 결론을 내렸다⁽¹⁾⁽²⁾⁽⁴⁾. 두 번째 평가에서는 ICE 시험법이 UN GHS에 규정된 안자극 또는 심한 안손상을 유발하지 않는 화학물질을 식별하기 위한 검색법으로 사용될 수 있다고 평가되었다⁽³⁾⁽⁴⁾. 검증연구 결과와 전문가 평가에 따라 ICE 시험법을 통해 심한 안손상을 유발하는 화학물질(UN GHS Category 1)을 식별할 수 있다는 기존의 권고사항이 그대로 유지되었다. 그 이유는 ICCVAM의 최초 검증 연구 수행에서 사용된 데이터베이스가 변경되지 않았기 때문이다. 이 단계에서 ICE 시험법의 적용범위를 다른 범주로까지 확대하자는 추가 권고는 나오지 않았다. 검증연구에서 사용된 *in vitro* 및 *in vivo* 시험 데이터에 대한 재평가가 수행되었고, 안자극 또는 심한 안손상을 유발하지 않는 화학물질을 식별하기 위해 ICE 시험법이 사용될 수 있는 지를 평가하는 데 초점이 맞추어졌다⁽⁵⁾. 재평가를 통해, ICE 시험법이 UN GHS에 규정된 안자극과 심한 안손상을 유발하지 않는 화학물질 역시 식별하기 위해 사용될 수 있다고 결론지어졌다⁽⁴⁾⁽⁵⁾. 본 시험법 가이드라인(2009년 채택, 2013년 개정)은 ICE 시험법에 대한 평가결과를 기반으로 한 활용법과 제한점을 담고 있다.
2. 다양한 화학물질이 유발하는 모든 범위의 자극을 예측하기 위해 단 하나의 *in vitro* 안자극시험이 토끼를 이용한 *in vivo* Draize 안점막자극시험을 대체할 수는 없다는 것이 일반적 견해이다. 그러나 단계적인 시험전략 내에서 여러 개의 대체 시험법을 잘 조합하여 수행할 경우 *in vivo* Draize 안점막자극시험을 대체할 수 있는 가능성은 있다⁽⁶⁾. 하향식 접근방식(Top-Down approach)⁽⁷⁾은 기존 정보에 근거하여 시험물질이 강한 안점막자극을 유발하는 것으로 예상되는 경우를 위해 설계되었고, 상향식 접근방식(Bottom-Up approach)⁽⁷⁾은 시험물질이 안자극을 일으키지 않는 것으로 예상되는 경우를 위해 설계되었다. ICE 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 독립적 대체시험법으로 검증받지는 않았지만, 추가시험 없이 심한 안손상을 유발하는 화학물질(UN GHS Category 1) 식별을 위한 하향식 접근방식 시험전략의 초기 시험법으로 추천된다⁽⁴⁾⁽⁷⁾. 또한 ICE 시험법은 UN GHS의 비자극(NC) 화학물질을 식별하기 위한 방법으로서⁽⁴⁾ 상향식 접근방식 시험전략의 초기 시험법으로 활용될 수 있다⁽⁷⁾. 그러나 ICE 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. 또한 UN GHS의 다른 분류체계 하에서 상향식 접근방식으로 ICE 시험법을 이용할 경우 해당 규제 당국과 협의해야 한다.

3. 본 가이드라인을 통해 적출된 닭 눈을 이용하여 시험물질의 독성 유발 정도를 측정해 눈에 유해할 수 있는 시험물질을 평가하고자 한다. 각막에 대한 독성은 (i) 혼탁도 정성 평가, (ii) 플루오레세인(fluorescein)을 눈에 투여한 후, 상피 손상도 정성 평가(플루오레세인 잔류도 측정), (iii) 증가한 두께(종창: corneal swelling) 정량 평가, (iv) 각막 표면의 형태적 손상도에 대한 육안 정성 평가에 의해 측정된다. 개별 측정된 각막 혼탁도, 종창, 손상도를 취합하여 안자극 분류(Eye Irritancy Classification: EIC)를 도출한다.

4. 본 가이드라인에서 사용된 용어의 정의는 VIII 항에 기술되어 있다.

III. 유의사항

1. 본 가이드라인은 미국동물대체시험법검증센터(ICCVAM)의 국제 검증연구⁽¹⁾⁽³⁾⁽⁹⁾ 이후 개발된 OECD 가이드라인 문서 160⁽⁸⁾에 제시된 프로토콜을 근거로 한다. ICCVAM의 국제 검증연구에는 ECVAM, JaCVAM, 네덜란드 응용과학연구기구(TNO)의 삶의 질 독성 및 응용약리과(Quality of Life Department of Toxicology and Applied Pharmacology)가 참여했다. 해당 프로토콜은 TNO가 사용하는 현 프로토콜과 기존에 발표된 프로토콜을 근거로 한다⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾⁽¹²⁾⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾.
2. 본 가이드라인이 근거로 한 검증연구에서 광범위한 화학물질이 시험되었고, 이 연구의 데이터베이스는 총 152개(단일물질 72개, 복합물질 80개)의 화학물질에 이른다⁽⁵⁾. 본 가이드라인은 고체, 액체, 유탁액, 겔에 적용할 수 있다. 액체는 수성 또는 비수성, 고체는 수용성 또는 비수용성일 수 있다. 기체와 에어로졸은 검증연구에서 아직 평가되지 않았다.
3. ICE 시험법은 심한 안손상을 일으키는 화학물질(UN GHS Category 1)을 식별하는 데 사용할 수 있다⁽⁴⁾. 이 경우, ICE 시험법의 제한점은 알코올에 대한 높은 위양성률(high false positive rate)과 고체와 계면활성제에 대한 높은 위음성률(high false negative rate)을 근거로 한다⁽¹⁾⁽³⁾⁽⁹⁾. 그러나 ICE 시험법의 위음성률(실제 UN GHS Category 1인 화학물질이 UN GHS Category 1이 아니라고 식별되는 경우)은 중요하지 않다. 결과가 음성으로 나온 모든 화학물질은 규제 요건에 따라 증거의 가중치(weight-of-evidence) 접근방식에 따른 단계적 시험전략으로 적절하게 검증된 *in vitro* 시험법 또는 최후의 선택으로 토끼를 이용한 시험법을 통해 재확인되기 때문이다. *In vivo* Draize 안자극시험에서 고체는 불규칙하고 극단적인 노출조건을 초래할 수 있고, 그 결과 해당 화학물질의 자극성과는 무관한 예측을 야기할 수 있다는 점에 유의해야 한다⁽¹⁵⁾. 시험자는 본 시험법을 모든 종류의 화학물질에 적용할 수 있다. 양성결과는 추가시험 없이도 심한 안손상을 유발하는 UN GHS Category 1로 분류한다. 그러나 알코올에서 얻어진 양성결과는 과다예측의 위험성을 고려하여 신중하게 해석되어야 한다.
4. 심한 안손상을 유발하는 화학물질(UN GHS Category 1)을 식별할 때, UN GHS 분류체계에 따라 분류된 *in vivo* 토끼 안점막자극시험 데이터와 비교하여 ICE 시험법의 전체 정확도는 86%(120/140), 위양성률은 6%(7/113), 위음성률은 48%(13/27)이다⁽⁴⁾⁽⁵⁾.

5. ICE 시험법은 안자극 또는 심한 안손상을 유발하지 않는 화학물질(UN GHS NC)을 식별할 때에도 사용될 수 있다⁽⁴⁾. 다른 분류체계 하에서 상향식 접근방법으로 ICE 시험법을 사용하기 전에 해당 규제당국과 협의해야 한다. 본 시험법은 모든 종류의 화학물질에 사용될 수 있으며, 음성결과는 안자극과 심한 안손상을 유발하지 않는 화학물질로 받아들여질 수 있다. 그러나 검증 데이터베이스 중 하나의 결과에 따르면, 오염방지 목적의 유기용매 함유 페인트는 과소평가될 수 있다⁽⁵⁾.
6. 안자극 및 심한 안손상을 일으키지 않는 화학물질(UN GHS NC)을 식별할 때, UN GHS 분류체계에 따라 분류된 *in vivo* 토끼 안점막자극시험 데이터와 비교하여 ICE 시험법의 전체 정확도는 82%(125/152), 위양성률은 33%(26/79), 위음성률은 1%(1/73)이다⁽⁴⁾⁽⁵⁾. 특정 화학물질(오염방지 유기용매 함유 페인트)을 데이터베이스에서 제외하면, ICE 시험법의 정확도는 83%(123/149), 위양성률은 33%(26/78), 위음성률은 0%(0/71)이다⁽⁴⁾⁽⁵⁾.
7. ICE 시험법은 안자극을 유발하는 화학물질(UN GHS Category 2 또는 2A) 혹은 약한 안자극을 유발하는 화학물질(UN GHS Category 2B)을 식별하는 방법으로 권장되지 않는다. 많은 수의 UN GHS Category 1 화학물질이 UN GHS Category 2, 2A 또는 2B 물질로 확인되었고, UN GHS NC 화학물질이 UN GHS Category 2, 2A 또는 2B 물질로 확인되었기 때문이다. 따라서 이러한 물질들은 다른 적절한 시험법을 이용한 추가시험이 필요하다.
8. 닭 눈을 이용하는 모든 과정에서 인간 또는 동물유래 검체(조직과 조직액 포함)를 다루는 것에 대한 시험기관의 규정과 절차를 준수해야 한다. 보편적인 실험실 주의사항을 준수할 것을 권장한다⁽¹⁶⁾.
9. ICE 시험법은 토끼 안점막자극시험에서 평가된 바와 같은 결막과 홍체에 대한 손상을 고려하지 않지만, 각막에 대한 영향을 다루고 있어, UN GHS를 위한 *in vivo* 분류의 중요한 지표이다. ICE 시험법 자체로는 각막 손상의 가역성을 판정할 수 없다. 다만, 토끼를 이용한 안점막자극시험에 근거하여 각막 손상의 초기 심각성의 평가를 통해 일부 비가역적 영향을 확인할 수 있다는 제안이 있었다⁽¹⁷⁾. 그러나 초기 심각한 손상과는 무관하게 발생하는 비가역적 영향을 이해하기 위해서는 과학적 지식이 더 많이 필요하다. 마지막으로 ICE 시험법은 눈을 통한 노출을 통해 전신독성의 가능성을 평가하는 데 활용될 수 없다.

10. 본 가이드라인은 새로운 지식과 데이터가 축적되면 주기적으로 개정될 것이다. 예를 들어, 각막 손상을 더 명확하게 파악하기 위해 조직병리학이 활용될 수 있다. 이와 관련된 가능성을 평가하기 위해 눈을 보존하고 조직병리학적 검체를 준비하는 것이 권고된다. 이를 통해 본 시험법의 정확도를 제고하고 데이터베이스를 구축하며 결정기준을 수립할 수 있다.
11. 본 시험법을 처음으로 확립하는 실험실은 부록 1에 제시된 숙련도를 입증해야 한다. 실험실은 유해물질 규제를 위한 분류용 ICE 시험법 데이터를 제출하기 전에 ICE 시험법 수행에 대한 기술적 역량을 입증하기 위해 부록 1의 화학물질을 사용할 수 있다.

IV. 시험의 원칙

1. ICE 시험법은 *in vitro* 닭 눈을 단기간 유지하여 적용하는 조직모델(organotypic model)을 이용한 시험법이다. 이 시험에서 시험물질에 의한 손상은 각막 종창, 혼탁도, 플루오레세인 잔류도로 측정된다. 후자의 두 지표는 정성평가인 반면, 각막 종창의 분석은 정량평가이다. 각각의 측정값은 종합적 자극지수(Irritation Index)를 산출하는 데 필요한 정량적 점수로 전환되거나, 정성적으로 범주화하여 *in vitro* 눈에 유해한 물질(UN GHS Category 1 또는 NC (비자극))을 분류하는데 사용된다. 이 결과들은 시험물질의 *in vivo* 심한 안손상 유발 또는 비유발 가능성을 예측하는 자료로 사용될 수 있다('결정기준(Decision Criteria)' 부분 참조). 그러나 ICE 시험법으로 심한 안손상을 유발한다고 예측되지 않거나 비자극 범주의 화학물질을 확인할 수 없다.

2. 닭의 눈 출처와 주령

- 닭의 눈은 사람의 식용을 목적으로 하는 도계장에서 수집한다. 이렇게 함으로써 실험동물의 사용을 배제한다. 사람의 식용에 적합한 건강한 닭의 눈만을 이용한다.
- 시험에 사용하기 적당한 닭의 주령을 평가한 통제된 연구는 없지만, 전통적으로 이 시험법에 이용되는 닭의 주령과 체중은 도계장에서 주로 취급하는 영계(약 7주령, 1.5 - 2.5 kg)에 속한다.

3. 눈의 수집과 운반

- 일반적으로 닭을 기절시킨 후 머리를 신속히 분리한다. 닭의 머리를 신속하게 운반하여 세균감염과 조직파괴를 최소화하기 위해 닭 공급처는 실험실에서 가까워야 한다. 시험의 허용기준에 맞추기 위해서는 닭 머리의 수집부터 눈을 적출하여 관류장치에 넣을 때까지 최소한의 시간(대략 2시간 이내)이 소요되어야 한다. 시험에 쓰이는 모든 닭의 눈은 도축일자가 동일해야 하고, 동일한 집단에서 수집되어야 한다.
- 눈은 실험실에서 적출하기 때문에, 도살장에서 생리식염수로 적신 화장지로 습도를 조절한 플라스틱 상자에 머리를 담고 상온(일반적으로 18°C에서 25°C 사이)에서 운반한다.

4. 눈의 선별 기준

- 적출한 후 무처리 조건에서도 높은 플루오레세인 염색(예, > 0.5) 또는 각막 혼탁도 점수(예, > 0.5)를 보이는 눈은 제외한다.
- 시험물질처리군과 양성대조군은 각각 최소 3개의 눈을 사용한다. 음성대조군 또는 용매대조군(식염수 이외의 용매를 사용할 경우)은 최소한 1개의 눈을 사용한다.
- GHS NC Category의 결과가 나온 고체 시료의 경우, 음성결과를 확정 또는 기각하기 위하여 3개의 눈을 이용한 재시험을 권장한다.

V. 시험절차

1. 눈 준비

- 각막에 손상을 가하지 않도록 주의하며 눈꺼풀을 잘라낸다. 각막의 무결성(integrity)을 평가하기 위해 2%(w/v) 플루오레세인나트륨(sodium fluorescein)한 방울을 각막 표면에 투여하고 수 초 후에 생리식염수로 씻어낸다. 각막 손상 여부를 확인하기 위해 플루오레세인으로 처리한 눈을 세극등현미경(slut-lamp microscope)으로 관찰한다(플루오레세인 잔류도와 각막 혼탁도 측정시

0.5 이하임을 확인).

- 각막이 손상되지 않은 경우, 손상에 주의하며 눈을 두개골로부터 분리한다. 수술 집게로 깜박임막(nictitating membrane)을 단단히 잡고 안구를 안와로부터 잡아당긴다. 눈의 근육은 끝이 무딘 굽은 가위로 잘라낸다. 너무 강한 압력을 주어서 각막이 손상이 되어 시험 결과의 오류를 일으키는 것을 피하는 것이 중요하다.
- 눈을 안와로부터 적출할 때, 육안으로 확인할 수 있는 시신경 일부가 남아 있어야 한다. 적출한 눈을 흡수패드에 올려놓고 깜박임막과 기타 결합조직을 잘라내어 제거한다.
- 적출한 눈을 스테인리스 스틸 클램프에 각막이 수직이 되도록 위치시킨다. 그 다음 클램프를 관류장치의 챔버에 옮긴다⁽¹⁸⁾. 이 때 각막 전체가 생리식염수에 의해(3-4 방울/분 또는 0.1-0.15 mL/분)에 적셔질 수 있도록 위치를 조정해야 한다. 관류장치의 챔버 온도는 $32 \pm 1.5^{\circ}\text{C}$ 로 유지한다. 부록 2에서 일반 관류장치와 눈 클램프의 모식도를 확인할 수 있다. 이 장치들은 구매하거나 직접 제작할 수 있다. 장치는 각 실험실의 필요에 따라 적절히 변형할 수 있다(예, 측정할 수 있는 눈의 숫자를 변화시킬 경우).
- 관류장치에 위치시킨 후에 세극등현미경으로 눈을 다시 검사하여 적출과정 중에 손상을 입지 않았음을 확인한다. 이 때 세극등현미경에 장착된 깊이측정기로 각막 꼭지점에서 각막의 두께를 측정한다. 눈이 (i), 플루오레세인 잔류도 > 0.5; (ii), 각막 혼탁도 > 0.5; 또는, (iii), 추가적인 손상의 징후가 있을 경우 교체한다. 이 기준에서 제외되지 않았더라도 각막의 두께가 전체 집단의 평균값에서 10% 이상 벗어나는 눈은 제외한다. 실험자는 세극등현미경의 세극광의 폭 조정 (slit-wide setting)이 다르면 각막의 두께가 다르게 측정될 수 있다는 것을 명심해야 한다. 세극광의 폭은 0.095 mm에 맞추어야 한다.
- 검사를 통과한 눈에 시험물질을 적용하기에 앞서 약 45~60분 동안 시험계에서 평형을 이룰 때까지 안정화시킨다. 각막 두께와 혼탁도를 측정하여 0 시간에서의 기저값을 정한다(시간=0). 적출과정에서 측정된 플루오레세인 잔류도를 해당 평가항목의 기저값으로 사용한다.

2. 시험물질의 적용

- 시간 0에서의 기저값을 정한 직후, 홀더에 든 눈을 관류장치에서 꺼내 수평으로 놓은 다음 각막에 시험물질을 적용한다.
- 일반적으로 액체 시험물질은 희석시키지 않은 채로 사용하지만, 필요(예 : 시험설계의 일환으로서)에 따라 희석시킬 수 있다. 시험물질 희석에 우선적으로 적용할 용매는 생리식염수이다. 그러나 통제된 조건 하에서 다른 용매를 사용할 수 있다. 단, 이에 대한 적합성을 입증해야 한다.
- 액체 시험물질을 각막 전체 표면에 고르게 적용한다. 표준 용량은 0.03 mL이다.
- 고체 시험물질은 유발과 유봉, 또는 이와 유사한 분쇄 도구를 이용하여 가능한 곱게 갈아서 사용한다. 고체 시험물질의 가루를 각막 전체 표면에 고르게 덮을 수 있도록 적용한다. 표준 중량은 0.03 g이다.
- 상온에서 시험물질(액체 원액 또는 고체)을 10 초 동안 적용하고 생리식염수(약 20 mL)로 씻어낸다. 눈을(클램프로 잡은 채로) 다시 관류장치로 옮겨서 수직으로 위치시킨다. 필요한 경우 다음 시험시점에서(예, 각막에서 시험물질의 잔재가 발견될 경우) 추가로 세척을 할 수도 있다. 일반적으로 추가로 세척에 사용하는 생리식염수의 양은 중요하지 않지만 화학물질이 각막에 붙어있는지 관찰하는 것은 중요하다.

3. 대조물질

- 각 실험마다 음성 또는 용매/부형제 대조군과 양성대조군을 둔다.
- 원액 또는 시험계에서 비특이적인 반응검출과 분석조건이 부적절한 결과를 도출하지 않는지를 확인하기 위해 음성대조군으로 생리식염수를 사용한다.
- 희석 액체를 시험할 경우 용매/부형제 대조군을 측정하여 시험계에서 비특이

적인 변화를 검출하고, 분석 조건 자체가 부적절하게 자극반응으로 나타나지 않도록 한다. 시험계에 대하여 유해효과가 없다는 것이 확실히 증명된 용매/부형제만 이용할 수 있다.

- 각 실험에 확인된 안자극물질을 양성대조군으로 포함시켜 적절한 반응이 유발된 사실을 입증한다. 이 가이드라인에서 이용하는 ICE 시험법은 안부식물질 또는 심한 안자극물질을 식별하는 것이기 때문에 양성대조군은 심한 반응을 유발하는 참고물질이 되어야 한다. 그러나 시간경과에 따른 양성대조반응의 변동성을 평가하려면 반응의 정도가 너무 강해서는 안 된다. 충분한 양성대조군의 *in vitro* 데이터를 확보하여 통계적으로 허용 가능한 범위의 양성대조군을 계산해 낼 수 있어야 한다. 만약 특정 양성대조군에 대한 적절한 ICE 시험법의 기존 데이터가 없으면 이 정보를 얻기 위한 시험을 수행하여야 한다.
- 액체 시험물질에 대한 양성대조물질의 예는 10% 초산(acetic acid) 또는 5% 염화벤잘코늄(benzalkonium chloride)이며, 고체 시험물질에 대한 양성대조물질의 예는 수산화나트륨(sodium hydroxide) 또는 이미다졸(imidazole)이다.
- 기준물질은 특정 화학물질 또는 제품계통에 속하는 미지의 화학물질의 안자극성을 평가하거나, 자극반응의 특정 범위 안에서 안자극물질의 상대적인 안자극성을 평가하는데 유용하다.

4. 평가항목 측정

- 각막은 시험물질 처치전과 처치/세척후 30, 75, 120, 180, 240분(± 5분)에 검사한다. 4시간에 걸친 처리 과정 동안 각막을 충분히 측정할 수 있다. 각 측정시점 간 충분한 시간 간격을 두어 처리된 모든 눈을 관찰할 수 있다.
- 평가항목은 각막 혼탁도, 종창, 플루오레세인 잔류도, 형태적 영향(예 : 상피함몰 또는 이완)이다. 플루오레세인 잔류도(시험물질 처리 전, 시험물질 노출 후 30분이 지난 시점에 측정)을 제외한 모든 평가항목은 위에서 언급된 시점에 측정한다.
- 각막 혼탁도, 플루오레세인 잔류도, 형태학적 변화를 기록하기 위해 사진을 찍어 기록하는 것을 권장하며, 만약 조직병리 실험을 하였다면 역시 사진을 찍어 기록한다.

- 4 시간째 마지막 검사를 시행한 후에 눈을 적절한 고정액(예, 중성 완충 포르말린)에 보존하여 향후 있을지 모를 조직검사에 대비하는 것을 권장한다⁽⁸⁾.
- 각막의 종창은 세극등현미경의 각막두께측정기로 잰 각막 두께로 측정한다. 각막의 종창은 아래의 공식에 따라 각막 두께 측정값에서 산출되어 백분율로 나타낸다.

$$\left(\frac{\text{시간 } t \text{에서 각막의 두께} - \text{시간 } 0 \text{에서 각막의 두께}}{\text{시간 } 0 \text{에서 각막의 두께}} \right) \times 100$$

- 모든 검사 시간 구분점에서 시험한 모든 눈들의 각막 종창의 평균백분율을 측정한다. 어느 시간 구분점에서 측정되었던지 간에 각막 종창의 최고 평균점수에 근거하여 각각의 시험물질에 대한 전체 범주의 점수를 산출한다.
- 각막 혼탁도는 가장 혼탁한 각막 부위를 측정하여 점수를 산출한다(표 1 참조). 관찰시점마다 모든 눈의 평균 각막 혼탁도를 계산한다. 이를 바탕으로 각 시험물질에 대한 전체 범주의 점수를 산출한다.

표 1. 각막 혼탁도 점수

점수	관찰내용
0	혼탁하지 않음
0.5	매우 희미한 혼탁
1	산재하거나 넓은 부위 혼탁; 홍채의 각 부위가 선명하게 보임
2	쉽게 확인할 수 있는 반투명 혼탁; 홍채의 각 부위가 약간 흐릿함
3	심한 각막의 혼탁; 홍채의 특정 부위 및 동공 크기 확인 불가
4	완전한 각막의 혼탁; 홍채를 구분할 수 없음

- 플루오레세인 잔류도는 30 분에서 관찰한 값만을 측정한다(표 2 참조). 모든 눈의 평균 플루오레세인 잔류도를 계산하고 이를 바탕으로 각 시험물질에 대한 전체 범주점수를 산출한다(결정기준 참조).

표 2. 플루오레세인 잔류도 점수

점수	관찰내용
0	플루오레세인 잔류량 없음
0.5	매우 약한 단일 세포 염색
1	단일 세포 염색이 각막 전체 부위에 산재
2	국소 또는 융합성의 고밀도 단일 세포 염색
3	융합된 넓은 부위의 각막에 플루오레세인이 잔류

- 형태적 영향에는 각막 상피세포의 “함몰(pitting),” 상피 “이완(roosening),” 각막 표면의 “거칠어짐(roughening),” 시험물질이 각막에 “접착(sticking)”하는 정도가 포함된다. 이들 (평가) 결과들은 그 강도가 다를 수 있으며, 동시에 나타날 수 있다. 결과의 분류는 시험자의 해석에 따라 주관적이다.

VI. 자료와 보고

1. 자료평가

- 각막 혼탁도, 종창, 플루오레세인 잔류도 결과를 개별적으로 평가하여 각 평가항목에 대한 ICE 분류를 도출한다. 각 평가항목에 대한 ICE 분류를 취합하여 각 시험물질에 대한 자극성 분류(Irritancy Classification)를 한다.

2. 결정기준

- 각 평가항목이 측정되면, 미리 마련된 기준에 근거하여 ICE 분류를 한다. 각막 종창(표 3), 혼탁도(표 4), 플루오레세인 잔류도(표5)의 분류체계를 아래와 같이 4개의 ICE 분류를 사용하여 평가한다. 표3에서 보여지는 각막 종창 점수는 Haag-Streit BP900 모델(이와 동등한 규격의 모델)의 세극등현미경을 사용해 깊이 측정기 no.1의 세극광의 폭을 9 $\frac{1}{2}$ (0.095 mm에 해당)로 조정하고 각막의 두께를 기록하였을 때만 적용될 수 있다.)

표 3. 각막 종창에 대한 ICE 분류 기준

평균 각막 종창(%)*	ICE 분류
0에서 5	I
>5에서 12	II
>12에서 18(>처치후 75 분)	II
>12에서 18(≤처치후 75 분)	III
>18에서 26	III
>26에서 32(>처치후 75 분)	III
>26에서 32(≤처치후 75 분)	IV
>32	IV

*어느 관찰시점이든지 최고 평균점수

표 4. 각막 혼탁도에 대한 ICE 분류 기준

최고 평균 혼탁도 점수*	ICE 분류
0.0-0.5	I
0.6-1.5	II
1.6-2.5	III
2.6-4.0	IV

*어느 관찰시점이든지 최고 평균점수(표 1의 혼탁도 점수에 근거)

표 5. 평균 플루오레세인 잔류도에 대한 ICE 분류 기준

처리 후 30 분이 지난 시점의 평균 플루오레세인 잔류도 점수*	ICE 분류
0.0-0.5	I
0.6-1.5	II
1.6-2.5	III
2.6-3.0	IV

*표 2의 점수를 바탕으로 산출

- 시험물질에 대한 *in vitro* 분류는 각막 종창, 각막 혼탁도, 플루오레세인 잔류도의 각 범주를 종합하여 표 6에 제공된 방식에 의하여 GHS 분류 체계에 따라 평가한다.

표 6. 전체 *in vitro* 분류

UN GHS 분류	평가항목 3개의 조합
No Category(비자극)	3 × I 2 × I, 1 × II
예측불가	기타 조합
Category 1	3 × IV 2 × IV, 1 × III 2 × IV, 1 × II* 2 × IV, 1 × I* 30분에 각막 혼탁도 ≥ 3 (최소 2개의 눈) 모든 관찰시점에 각막 혼탁도 = 4 (최소 2개의 눈) 상피의 심한 이완(최소 1개의 눈)

*조합 발생 가능성 낮음

3. 시험의 타당성 기준

- 음성 또는 용제/용매 대조군 및 양성대조군이 각각 GHS NC 및 Category 1으로 확인되면 시험이 타당하다고 간주된다.

VII. 결과보고

- 시험보고서는 시험의 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
 - 눈의 출처 관련 정보(예 : 눈을 수집한 장소)
- 시험법 조건
- 사용한 시험계의 설명
 - 사용한 세극등현미경에 관한 정보(예 : 모델명) 및 기기 설정사항
 - 음성 및 양성대조군의 측정된 결과에 대한 참고문헌, 타당한 기준 대조군 범위를 입증하는 측정된 데이터
 - 시간 경과에 따른 시험법의 무결성(정확도 및 신뢰도)을 확보하기 위한 절차 (예 : 숙련도 입증 화학물질을 이용한 주기적 시험)
- 눈의 수집 및 준비
- 닭의 주령과 체중 및 기타 특징(예 : 성별, 계통)
 - 눈의 보관과 운반 조건(예, 눈을 수집한 날짜와 시간, 닭의 머리를 수집한 후 적출된 눈을 관류장치 챔버에 넣는 데까지 소요된 시간)
 - 눈의 준비와 장치; 눈의 품질, 챔버의 온도, 시험에 사용한 눈 선택의 기준
- 시험 절차
- 시험을 반복한 횟수
 - 사용된 음성 및 양성대조군의 정보(가능하다면 용제와 기준물질도 포함)
 - 시험물질의 농도, 적용, 노출시간
 - 관찰 시점 (처리 전과 후)
 - 결과의 평가와 평가기준에 대한 설명
 - 시험의 타당성 기준에 대한 설명

- 시험절차 수정 시 이에 대한 기록 및 설명

○ 결과

- 모든 관찰 시점에서 개개의 눈으로부터 얻은 각막 종창, 각막 혼탁도, 플루오레세인 잔류도 점수와 모든 눈의 평균 점수를 표시한 표 작성
- 각막 종창, 각막 혼탁도, 플루오레세인 잔류도 점수의 최고 평균값과 여기서 도출한 ICE 분류
- 관찰한 다른 결과에 대한 설명
- 도출한 *in vitro* GHS 분류
- 필요하면 눈의 사진

○ 고찰

○ 결론

VIII. 용어정의

1. **정확도(Accuracy)** : 시험결과와 참고치의 일치 정도. 시험 수행에 대한 평가 척도이고 상관성(relevance)의 한 측면이다. 정확도는 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. 양성의 결과가 나오는 다른 화학물질로부터 음성의 결과가 나오는 화학물질을 구별하는 것으로 시작한다.
4. **각막(Cornea)** : 홍채와 동공을 덮고 있는 빛을 통과시키는 안구전면의 투명한 부분
5. **각막혼탁도(Corneal opacity)** : 시험물질에 의한 각막의 불투명 정도. 각막 혼탁도 증가는 각막 손상정도를 나타낸다.
6. **각막종창(Corneal swelling)** : ICE 시험법에서 시험물질에 노출된 후 각막의 팽창의 정도를 재는 객관적 척도. 이 척도는 기저치(처리 전)의 각막 두께와 ICE 시험법에서 시험물질에 노출된 후 일정한 시간 간격에서 측정된 각막 두께의 백분율로써 나타낸다. 각막 종창의 정도는 각막 손상의 지표이다.
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⁽⁴⁾.
8. **위음성률(False negative rate)** : 음성으로 판정되는 모든 양성물질의 비율
9. **위양성률(False positive rate)** : 양성으로 판정되는 모든 음성물질의 비율
10. **플루오레세인 잔류도(Fluorescein retention)** : ICE 시험법에서 시험물질에 노출된 후 각막의 상피세포에 남아 있는 플루오레세인나트륨의 양으로 표시되는 주관적인

측정이다. 플루오레세인 잔류의 정도는 각막 상피의 손상의 지표이다.

11. 유해성(Hazard) : 물질이 생명체, 생태계 또는 특정 인구집단에 노출될 때, 위해영향을 야기할 가능성이 있는 물질 또는 상황(situation)의 본질적 특성

12. 눈에 미치는 비가역적인 영향(Irreversible effects on the eye) : "심한 안손상"항과 "UN GHS Category 1"항 참고

13. 복합물질(Mixture) : 서로 반응하지 않는 2가지 이상의 물질로 구성된 복합물질 또는 용액⁽⁴⁾

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) 또는 심한 안손상(UN GHS Category 1)으로 분류되지 않은 화학물질. "UN GHS No Category" 의미와 바꾸어 사용할 수 있다.

16. 양성대조군(Positive control) : 시험의 모든 구성요소를 포함하고 양성 반응을 유도한다고 알려진 물질로 처리한 군. 시간에 따른 반응 정도를 평가하기 위해 사용한다.

17. 신뢰도(Reliability) : 동일한 시험방법으로 반복하여 시행하였을 때 동일 실험실과 다른 실험실에서 시험 결과를 재현할 수 있는 정도. 신뢰도는 실험실 내, 실험실 간 재현성(reproducibility)으로 평가된다.

18. 눈에 미치는 가역적 영향(Reversible effects on the eye) : "안자극"항과 "UN GHS Category 2" 참고

19. 심한 안손상(Serious eye damage) : 안구 앞면에 시험물질 적용 후 21일 이내에 회복되지 않는 안조직 손상 또는 시력의 심각한 손상으로, "눈에 미치는 비가역적 영향"과 "UN GHS Category 1"⁽⁴⁾ 의미와 바꾸어 사용할 수 있다.

20. 세극등현미경(Slit-lamp microscope) : 입체적인 정립상을 구현하는 양안현미경의 확대 영상에서 눈을 직접 관찰할 수 있는 장치. ICE 시험법에서 이 장치는 닭 눈의 앞쪽 구조를 관찰하고, 장착된 깊이측정기를 이용하여 객관적인 각막의

두께를 측정하기 위하여 사용한다.

21. 용매·부형제 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 동시에 사용될 때, 용매·부형제에 대한 시험계와의 반응여부를 보여준다.

22. 단일물질(Substance) : 생산과정을 통해 얻어지거나 또는 자연상태로 얻는 화학원소들(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⁽⁴⁾.

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

24. 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.

25. 시험물질(Test chemical) : 시험법에서 평가되는 화학물질(단일물질 또는 복합물질)

26. 단계적 시험전략(Tiered testing strategy) : 시험물질에 대한 기존의 모든 정보를 특정 순서에 따라 검토하는 단계적인 시험전략. 다음 단계로 진행하기 전에 위험분류를 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.

27. 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 화학

물질의 유해 정보를 전달하여, 사람(고용주, 근로자, 운송자, 소비자, 응급처치자 등)과 환경을 보호하고자 제시된 체계이다⁽⁴⁾.

28. UN GHS Category 1 : “심한 안손상”항과 “눈에 미치는 비가역적인 영향” 참고

29. UN GHS Category 2 : “안자극”항과 “눈에 미치는 가역적인 영향” 참고

30. UN GHS No Category : UN GHS Category 1 또는 2(2A 또는 2B)로 분류되지 않는 화학물질. “Not Classified”로 바꾸어 사용할 수 있다.

31. 검증된 시험법(Validated test method) : 특정한 목적에 대한 신뢰도와 적절성(정확도 포함)을 평가하기 위한 검증연구를 마친 시험법

32. 증거의 가중치(Weight-of-evidence) : 시험물질의 잠재적인 유해성에 관한 결론에 도달하기 위해 활용되는 다양한 정보들의 확실성과 취약성을 고려하는 과정

IX. 참고문헌

1. ICCVAM (2007). 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_tmer.htm]

2. ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. Available:

[<http://ecvam.jrc.it/index.htm>].

3. ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report - Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Mild/Moderate Ocular Irritants: The Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. 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>]

4. United nations (UN) (2011). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fourth revised edition, UN New York and Geneva, 2011. Available at:

[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html]

5. Streamlined Summary Document Supporting OECD Test Guideline 438 on the Isolated Chicken Eye for Eye Irritation/Corrosion. Series on Testing and Assessment no. 188 (Part 1 and Part 2), OECD, Paris.

6. OECD (2012). Test Guideline 405. OECD Guidelines for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. DOI : 10.1787/9789264185333-en.
7. Scott L, Eskes C, Hoffman S, Adriaens E, Alepee N, Bufo M, Clothier R, Facchini D, Faller C, Guest R, Hamernik K, Harbell J, Hartung T, Kamp H, Le Varlet B, Meloni M, Mcnamee P, Osborn R, Pape W, Pfannenbecker U, Prinsen M, Seaman C, Spielmann H, Stokes W, Trouba K, Vassallo M, Van den Berghe C, Van Goethem F, Vinardell P, Zuang V (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace in vivo Studies Using Bottom-up and Top-down Approaches. *Toxicology In Vitro* 24, 1-9.
8. 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, OECD, Paris.
9. ICCVAM. (2006). Background review document: Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method. NIH Publication No.: 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Available at:
[\[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm\]](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm)
10. Prinsen, M.K. and Koëter, B.W.M. (1993). Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. *Fd Chem Toxicol.* 31:69-76.
11. DB-ALM (INVITTOX) (2009). Protocol 80: Chicken enucleated eye test (CEET) / Isolated Chicken Eye Test, 13pp. Available:
[\[http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/\]](http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/).
12. Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. and Spielmann H. (1995). The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicol. In Vitro* 9:871-929.

13. Prinsen, M.K. (1996). The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. *Food Chem. Toxicol.* 34:291-296.
14. Chamberlain, M., Gad, S.C., Gautheron, P. and Prinsen, M.K. (1997). IRAG Working Group I: Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation. *Food Chem. Toxicol.* 35:23-37.
15. Prinsen, M.K. (2006). The Draize Eye Test and *in vitro* alternatives; a left-handed marriage? *Toxicology in Vitro* 20,78-81.
16. 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:
[\[http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf\]](http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf).
17. 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.
18. Burton, A.B.G., M. York and R.S. Lawrence (1981). The *in vitro* assessment of severe irritants. *Fd Cosmet.- Toxicol.* 19, 471-480.

부록 1. ICE 시험법 숙련을 위한 시험물질

ICE 시험을 시작하기에 앞서 표 1의 13개 물질에 대한 눈의 유해성 분류를 정확하게 판별하여 숙련도를 입증해야 한다. 이 물질들은 토끼를 이용한 안점막시험 (TG 405) 결과와 UN GHS 분류 체계(Categories 1, 2A, 2B, 또는 No Category)를 기반으로 눈에 대한 유해성 반응범위를 나타내기 위하여 선정되었다⁽⁴⁾⁽⁶⁾. 상업적으로 얻을 수 있는 가능성, *in vivo* 자료 유무, ICE 시험법에서 얻은 *in vitro* 자료의 유무에 따라 선정하였다. '요약정리문서'⁽⁵⁾와 'ICCVAM의 ICE 시험법 근거 자료문서'⁽⁹⁾를 참고할 수 있다.

표 1: ICE 시험법 숙련을 위한 시험물질

Chemical	CASRN	Chemical Class ¹	Physical Form	<i>In Vivo</i> Classification ²	<i>In Vitro</i> Classification ³
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-tartaric 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 predictions can be made ⁴
Ammonium nitrate	6484-52-2	Inorganic salt	Solid	Category 2A ⁵	No predictions can be made ⁴
Ethyl-2-methylacetoacetate	609-14-3	Ketone, Ester	Liquid	Category 2B	No predictions can be made ⁴
Dimethyl sulfoxide	67-68-5	Organic sulphur compound	Liquid	No Category	No Category
Glycerol	56-81-5	Alcohol	Liquid	No Category	No Category (borderline)
Methylcyclopentane	96-37-7	Hydrocarbon (cyclic)	Liquid	No Category	No Category
n-Hexane	110-54-3	Hydrocarbon (acyclic)	Liquid	No Category	No Category
Triacetin	102-76-1	Lipid	Liquid	Not classified	No Category

※ 약어: CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number

¹Chemical 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>)

²Based on results from the *in vivo* rabbit eye test (OECD TG 405) and using the UN GHS⁽⁴⁾⁽⁶⁾.

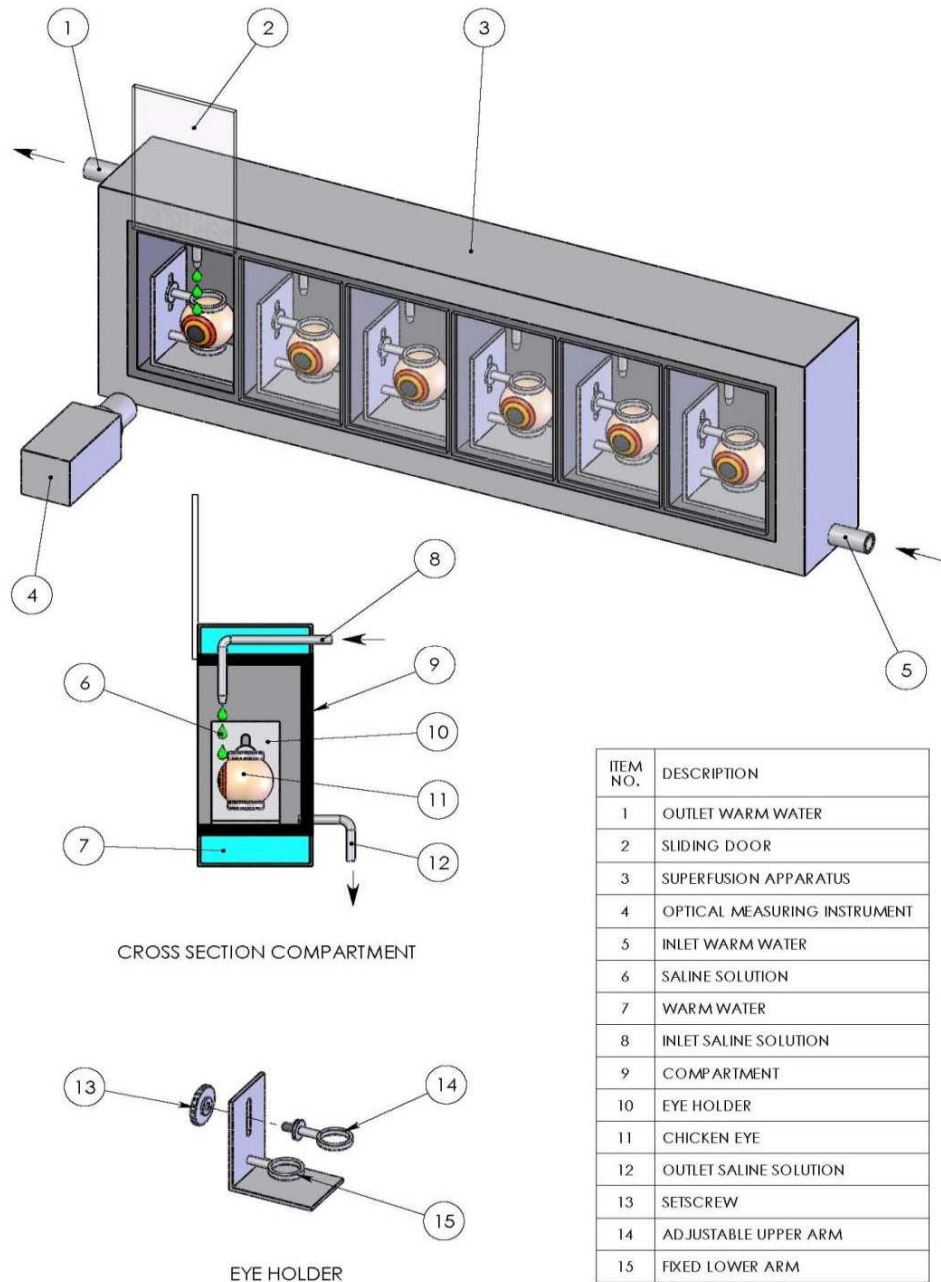
³Based on results in ICE as described in table 6.

⁴Combination of ICE scores other than the ones described in table 6 for the identification of GHS no-category and GHS Category 1 (see table 6)

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 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 2. ICE 관류장치와 눈 클램프의 모식도

(관류장치와 눈 클램프에 대한 추가적인 정보는 *Burton et al.*⁽¹⁸⁾ 참조)



화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인(VI)

발 행 일 2015월 5월

발 행 처 식품의약품안전처
 식품의약품안전평가원 바이오생약심사부 화장품심사과

발 행 위 원 손여원, 이윤제, 손수정, 이정표, 김정근, 김태성, 김주환,
 김도정, 김선희, 이정선, 고경욱, 안일영
