

등록번호

안내서-0755-01

화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인 (Ⅶ) (민원인 안내서)

- 단회투여독성시험법 -
용량고저법
(Up and Down Procedure)

2015. 9.



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

독성평가연구부 특수독성과

지침서·안내서 제·개정 점검표

명칭

화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인(Ⅷ) (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. <div style="display: flex; justify-content: space-around; font-weight: bold; font-size: 1.2em;"> 2017년 5월 31일 </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 10px;"> <div style="text-align: center;"> 담당자 확 인(부서장) </div> <div style="text-align: center;"> 고 경 육 이 종 권 </div> </div> | | |

이 안내서는 화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인(VII)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 9월 11일 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 | B1-2015-4-003 | 2015.9.11 | 화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인(VII) 제정 |
| 2 | 안내서-0755-01 | - | 「식약처 지침서등의 관리에 관한 규정」 개정에 따른 일괄 재분류 (규제개혁담당관실-3761호,2017.5.16) |

목 차

| | |
|--|----|
| I. 서론 | 1 |
| II. 개요 | 2 |
| III. 유의사항 | 2 |
| IV. 한계시험의 원리 | 3 |
| V. 본시험의 원리 | 4 |
| VI. 시험준비 | 4 |
| VII. 시험방법 | 6 |
| VIII. 관찰 | 10 |
| IX. 결과보고 | 11 |
| X. 용어정의 | 16 |
| XI. 참고문헌 | 19 |
| 부록 1. 투여방법: 본시험에서 투여순서 | 21 |
| 부록 2. 시험종료기준의 가능도비추정치 계산 | 24 |
| 부록 3. 동물시험을 수행하지 않고 LD ₅₀ 가 2000 mg/kg를 초과할 것으로 예상되는 시험물질의 분류 기준 | 33 |

「화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인」 (VII) 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 가이드라인은 시험물질의 급성경구독성을 평가하는 방법을 기술하고 있으며, 동물시험에 있어 필요한 동물의 숫자를 최소화하는데 그 가치가 있다. 이 시험법으로 LD₅₀과 그 신뢰구간을 계산할 수 있으며, 그 결과는 급성독성을 유발하는 물질을 국제조화시스템(Globally Harmonized System for the classification of chemicals)에 따라 등급을 매기고 분류하는데 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 425번(Acute Oral Toxicity - Up-and-down-Procedure (UDP)에 근거하며 마련되었다.

II. 개요

1. 용량고저법(up-and-down procedure: UDP)의 개념은 Dixon과 Mood가 처음으로 제안하였다⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾. 1985년 Bruce는 화학물질의 급성독성을 평가하는데 UDP를 사용하자고 제안하였다⁽⁵⁾. LD₅₀을 계산하는 UDP 실험설계에는 몇 가지 방식이 존재하는데, 본 가이드라인은 Bruce가 제안한 방식을 따르고 있으며
i) 화학물질의 분류를 위한 조화된 LD₅₀의 판정값(cut-off)에 대한 국제적인 동의를 이루어졌고, ii) 한 쪽 성별(대개 암컷)에서 시험하는 것이 전반적으로 충분하다고 여겨졌으며, iii) 점추정(point estimate)이 의미가 있으려면, 신뢰구간(confidence interval, CI)을 계산하는 것이 필요하였기 때문에 마련되었다.
2. 본 가이드라인에서 설명하고 있는 시험절차는 시험물질의 급성경구독성을 평가하는데 필요한 동물의 숫자를 최소화하는데 그 가치가 있다. LD₅₀와 신뢰구간의 계산에 추가하여, 이 시험은 독성의 징후를 관찰하는 것을 가능하게 한다.
3. 특정한 목적에 맞는 가장 적절한 시험법을 선택하기 위한 지침은 경구독성시험에 대한 지침문서(Guidance Document on Oral Toxicity Testing)⁽⁶⁾를 참고한다. 이 지침문서는 본 가이드라인의 수행과 해석에 관한 추가적인 정보도 수록하고 있다.
4. 본 가이드라인에서 사용된 용어의 정의는 X 항에 기술되어 있다.

III. 유의사항

1. 시험을 시작하기에 앞서 시험물질에 대하여 가능한 모든 정보를 고려해야 한다. 이런 정보에는 시험물질명(identity)과 화학구조, 물리화학적 성질, 해당물질의 모든 in vitro 또는 in vivo 독성시험 결과, 구조적으로 연관이 있는 물질 또는 유사한 복합물질의 독성자료, 시험물질의 예상용도 등을 포함한다. 이러한 정보는 인류의 건강과 환경의 보호를 위하여 시험의 타당성을 결정하는데 유용하며, 적절한 시작용량을 정하는데 도움을 준다.
2. 이 시험법으로 LD₅₀와 그 신뢰구간을 계산할 수 있으며, 그 결과를 가지고 급성독성을 유발하는 물질의 분류를 위한 국제조화시스템(Globally Harmonized System for the classification of chemicals)에 따라 물질의 등급을 매기고 분류할 수 있다⁽⁷⁾.
3. LD₅₀ 및 용량-반응 곡선의 기울기에 관한 예비추정을 할 수 있는 정보가 없을 때,

첫 번째 투여용량은 175 mg/kg으로 시작할 것을 권고한다. 약 175 mg/kg에서 시작하고 용량과 용량 사이는 half-log 단위(공비 3.2에 해당)를 사용하면 최적의 결과가 나온다. 만약 어떤 물질의 독성이 매우 높을 것으로 예상되면, 시작용량을 조정해야 한다. Half-log 간격은 실험동물을 더 효율적으로 이용할 수 있도록 하고 LD₅₀ 값을 예측하는데 있어 정확성을 높인다. 이 시험법은 시작용량 선정이 중요하므로, 시작용량은 예상되는 LD₅₀ 값보다 낮게 설정해야 한다(용량순서 그리고 시작용량에 대해서는 VII-3-나항 및 부록 1 참조). 그러나 다른 급성독성시험법과 마찬가지로, 변동성이 큰 화학물질(즉, 낮은 용량-반응 기울기)의 경우 치사율의 계산에 여전히 편차가 생길 수 있으며, LD₅₀ 값을 통계적 큰 오류를 갖게 된다. 이것을 교정하기 위하여, 본시험(main test)은 고정된 횟수의 시험관찰보다는 추정치의 특성에 맞춘 시험종료기준(stopping rule)을 이용한다(VII-3-다항 참조).

4. 본 시험법은 하루 또는 이틀 안에 사망을 유발하는 물질에 가장 용이하게 적용된다. 본 시험법은 사망이 상당히 지연될 것으로 예상되는 경우(5일 이상)에는 실용적이지 못하다.
5. 동물별로 시험순서를 정하고 최종 추정치를 빠르게 산출하기 위해서 컴퓨터를 사용한다.
6. 부식성이나 심각한 자극성이 있어서 과도한 통증이나 고통을 일으키는 용량에서는 시험물질을 투여할 필요가 없다. 시험물질의 독성에 의해 실험동물이 빈사상태이거나, 확연한 통증이 있거나, 심각하고 지속적인 고통의 징후를 보이는 동물은 인도적으로 폐사 시켜야 한다. 이들은 시험에서 사망한 동물로 해석한다. 빈사상태이거나 심각하게 고통 받는 동물을 폐사시킬 때의 결정기준, 예상되는 사망에 대한 안내는 별도의 OECD 지침문서를 참고한다⁽⁸⁾.
7. 한계시험(limit test)은 낮은 독성을 가질 것으로 예상되는 시험물질을 식별하는데 유용하게 사용될 수 있다.

IV. 한계시험의 원리

1. 한계시험(limit test)은 최대 5마리의 동물을 순차적으로 사용하는 시험이다. 2000 mg/kg, 또는 특수한 경우 시험용량으로 5000 mg/kg를 사용할 수 있다. 2000 mg/kg과 5000 mg/kg를 시험하는 절차는 약간 다르다(2000 mg/kg의 한계시험은 VII-2-가항, 5000 mg/kg의 한계시험은 VII-2-나항 참조). 순차적

시험계획을 선택함으로써 통계적 검정력(statistical power)은 증가되며, LD₅₀ 값이 한계용량에 가까운 화학물질인 경우 안전성 관점에서 의도적으로 한계시험을 하지 않는 방향으로 돌릴 수 있다. 다른 모든 한계시험법과 마찬가지로, 어떤 시험물질의 실제 LD₅₀ 값이 한계용량과 가까워질수록 시험물질을 올바르게 분류할 확률은 감소한다.

V. 본시험의 원리

1. 본시험(main test)은 시험물질의 투여용량을 한 단계씩 증감하는 시험으로, 시험물질을 한 번에 한 마리 씩, 최소 48시간 간격을 두고 동물에 투여한다. 첫 번째 동물에는 예상 LD₅₀ 값보다 한 단계 낮은 용량을 투여한다. 만약 첫 번째 동물이 살아남으면, 두 번째 동물에는 첫 번째 용량의 3.2배 증가한 용량을 투여한다. 만약 첫 번째 동물이 죽는 경우 그 다음 동물에는 동일한 공비로 감소시킨 용량을 투여한다(주의: 3.2는 기본설정값(default factor)로서 용량변화에 있어서 half-log 단위에 상응한다. VII-3-나항은 용량간격의 계수 선택에 대한 자세한 설명을 기술하고 있다).
2. 다음 동물에 투여를 할지, 얼마나 투여할지 결정을 내리기 전에 동물을 최대 48시간까지 주의 깊게 관찰하여야 한다. 이런 결정은 48시간 동안 모든 동물의 생존양상을 보고 내려진다(투여간격의 선택에 관해서는 VII-3-가항 및 VII-3-마항 참조). 시험종료기준은 실험동물의 수를 줄이기 위해 사용되며, 또한 부적절한 초기용량이나 또는 낮은 기율기의 영향을 줄일 수 있도록 투여패턴을 조정해 준다(VII-3-라항 참조).
3. 시험종료기준 중 하나를 충족하면 (VII-3-다항 및 IX-2-가항 참조) 투여를 중단하며, 이 때 LD₅₀의 추정치와 신뢰구간은 시험종료 시점에서의 모든 동물의 상태에 따라 계산한다. 대부분의 경우, 동물시험의 결과 처음으로 역전반응이 일어난 이후, 단 4마리의 동물로 시험은 완결된다. LD₅₀는 최대가능도추정치(maximum likelihood) 방법으로 계산한다⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾(IX-2-가항 및 IX-2-다항 참조).
4. 본시험의 결과는 신뢰구간을 계산하는 컴퓨터모델의 시작점으로 이용된다. 신뢰구간에 대해서는 IX-3-가항에서 설명한다.

VI. 시험준비

1. 동물 종의 선정

가. 다른 설치류도 사용할 수 있지만, 선호하는 설치류는 랫드이다. 일반적으로 암컷이 사용된다⁽⁶⁾. 기존의 LD₅₀ 시험에 관한 문헌조사에서 성별간의 민감도의 차이가 거의 없지만, 차이가 있는 경우에 암컷이 약간 더 민감한 것으로 나타나기 때문이다⁽¹¹⁾. 그러나 만약 구조적으로 관련이 있는 시험물질들의 독성학적 또는 독성동력학적인 성질을 보아 수컷이 더 민감하다면 수컷을 이용해야 한다. 수컷을 사용할 경우 타당한 사유를 제시해야한다.

나. 실험실에서 흔히 사용하는 계통으로 젊고 건강하고 성숙된 동물을 이용하며, 암컷은 임신과 출산의 경험이 없는 것을 사용한다. 시험물질 투여를 시작할 때, 동물의 주령은 8-12 주, 체중은 동물들의 평균 체중의 $\pm 20\%$ 이내에 들어야 한다.

2. 사육 및 식이조건

실험동물 사육실의 온도는 22°C ($\pm 3^\circ\text{C}$)로 유지한다. 상대습도는 최소 30% 그리고 청소할 때를 제외하고는 70%를 넘지 않아야 하지만 최적습도는 50 ~ 60%이다. 인공조명을 사용하고, 12시간 주기의 명암순환이 되도록 조절한다. 동물은 각자 개별 케이지에서 사육한다. 일반적인 설치류 먹이를 사용하고 음수는 무제한 제공한다.

3. 동물 준비

동물은 무작위로 선발하고 개체식별을 위해 표식을 한다. 시험물질 투여 최소 5일 전부터 케이지에 넣어서 실험실 환경에 적응하게 한다. 다른 순차적 실험설계와 마찬가지로, 실험동물의 수 및 주령이 적당한 범위 안에 있는지 주의를 기울여야 한다.

4. 시험물질의 준비

일반적으로 시험물질은 시험하고자 하는 용량범위에서 투여농도를 조정하여 투여액량을 일정하게 고정하여 투여한다. 그러나 액상제품 또는 혼합물을 시험할 때, 일정한 농도에서 희석하지 않은 시험물질을 사용하는 것이 해당 물질의 위험성을 평가하는데 더 적절할 수 있다. 어떤 경우에서든 최대 투여액량을 초과하지 않도록 한다. 한 번에 투여할 수 있는 액체의 최대 투여액량은 실험동물의 체중에 따라 달라진다. 설치류에서 투여액량은 1 mL/100 g (체중)을 넘지 않아야 한다; 그러나 수용액인 경우에는 2 mL/100 g (체중)까지도 가능하다. 투여할 시험물질은 우선 물을 사용한 수용액/현탁액/유화액이 선호되며, 그

다음으로 오일(예: 옥수수 오일)을 사용한 액상/현탁액/유화액, 그 다음으로 적합한 용매를 사용하여 조제하도록 한다. 물 이외의 다른 용매를 사용하는 경우에는 그 용매 자체에 독성학적 특성이 있는지를 알아야한다. 실험기간 동안 조제물의 안정성이 확보되지 않는다면 투여직전에 조제하도록 한다.

VII. 시험방법

1. 투여

가. 위관이나 적당한 삽입관을 사용하여 경구투여(gavage)방식으로 단일용량의 시험물질을 투여한다. 또한, 한번에 투여하는 것이 곤란한 시험물질인 경우 24시간이내에 분할투여할 수 있다.

나. 투여 전 동물을 절식시켜야 한다(예, 랫드의 경우 하룻밤 동안, 마우스의 경우는 3-4시간 사료를 공급하지 않고 음용수만 제공한다). 절식 후, 동물의 체중을 재고, 그 다음 시험물질을 투여한다. 절식 후 동물의 체중에 따라 용량을 계산한다. 시험물질을 투여한 후 랫드는 3-4시간, 마우스는 1-2시간 동안 추가로 절식시킬 수도 있다. 분할 투여할 경우에는 그 기간에 따라 사료와 물을 동물에게 공급할 필요가 있을 수 있다.

2. 한계시험

한계시험은 실험자가 기존의 독성정보를 통해 시험물질이 독성이 없거나 규제 한계용량 이하의 독성을 가질 것으로 예상되는 경우에 주로 실시한다. 시험물질의 독성정보는 이미 시험이 완료된 유사한 화학물질(compounds), 혼합물(mixtures) 또는 제품에 대한 정보로부터 얻을 수 있다. 이 때 독성학적으로 중요하다고 알려진 구성요소의 함유율 및 성분명(identity)을 고려해야 한다. 시험물질에 대한 독성학적 정보가 충분하지 않거나 독성이 강할 것으로 예측되는 경우에는 본시험을 실시한다.

가. 2000 mg/kg에서 한계시험

- (1) 해당용량의 시험물질을 한 마리의 동물에 투여한다. 동물이 사망하는 경우, 본시험을 수행하여 LD₅₀ 값을 구하고, 동물이 생존하는 경우, 추가로 4마리의 동물에 순차적으로 투여한다. 즉, 총 5마리의 동물을 사용한다. 만일, 5마리 실험동물 중 3마리의 동물이 사망하면 한계시험을 종료하고 본시험을 수행한다. 그러나, 세마리 이상의 동물이 살아남으면 LD₅₀는 2000 mg/kg

이상으로 판단한다. 동물 한 마리가 예상치 못하게 시험진행 후기에 갑자기 사망하고 다른 동물들이 살아남는 경우에는, 투여를 중단하고 생존한 다른 동물들에 대해서 비슷한 관찰기간내에 사망이 발생하는지를 관찰한다(초기 관찰기간에 대하여 VII-3-가항 참조). 시험진행 후기에 사망한 동물은 다른 사망과 동일한 것으로 처리하여 평가한다. 결과는 다음과 같이 평가한다(O = 생존, X = 사망).

(2) 세마리 이상의 동물이 사망하면 LD₅₀ 값은 시험용량(2000 mg/kg)보다 작다.

- O XO XX
- O OX XX
- O XX OX
- O XX X

만약 세 번째 사망한 동물이 나오면, 본시험을 수행한다.

(3) 다섯마리의 동물을 실험한다. 세마리 이상의 동물이 살아남으면 LD₅₀ 값은 시험용량(2000 mg/kg)보다 크다.

- O OO OO
- O OO XO
- O OO OX
- O OO XX
- O XO XO
- O XO OO/X
- O OX XO
- O OX OO/X
- O XX OO

나. 5000 mg/kg에서 한계시험

(1) 예외적으로, 특별한 규제가 필요하다고 판단되는 경우, 5000 mg/kg 용량을 고려할 수도 있다(부록 3 참조). 동물복지 차원에서 GHS Category 5 범위(2000-5000 mg/kg)에서 동물실험은 권장하지 않으나, 시험결과가 인간과 동물의 건강 또는 환경을 보호하는 것과 직접적인 관련이 있을 것으로 예측되는 경우에는 고려될 수 있다.

(2) 해당용량의 시험물질을 한 마리의 동물에 투여한다. 만약 동물이 사망하면 본시험을 시행하여 LD₅₀ 값을 정한다. 만약 동물이 살아남으면, 추가로 다른 두 마리의 동물에 투여한다. 만약 두 마리 모두 살아남으면, LD₅₀ 값은 한계용량(5000 mg/kg)보다 높은 것으로 판단하고 시험은 종료된다(즉, 더 이상의 동물투여 없이 14일간 관찰을 실시함).

(3) 첫 번째 동물이 살아남은 후, 한 마리 또는 두 마리 모두 사망하면, 시험물질을 순차적으로 추가로 다른 두 마리에 투여한다. 만약 한 동물이 예상치 못하게 시험 진행 후기(투여 후 48시간 이후)에 사망하고 다른 동물들이 살아남으면, 투여를 중단하고 다른 동물들이 같은 비슷한 관찰기간 내에 사망이 발생하는 지 관찰한다(초기 관찰기간에 대해서는 III-6항 참조). 시험 진행 후기에 사망한 동물은 다른 사망과 동일한 것으로 평가한다. 결과는 다음과 같이 평가한다(O = 생존, X = 사망).

(4) 세마리 이상의 동물이 사망하면 LD₅₀ 값은 시험용량(5000 mg/kg)보다 작다.

O XO XX

O OX XX

O XX OX

O XX X

(5) 세마리 이상의 동물이 살아남으면 LD₅₀ 값은 시험용량(5000 mg/kg)보다 크다.

O OO

O XO XO

O XO O

O OX XO

O OX O

O XX OO

3. 본시험

가. 한 마리씩 순차적으로 48시간 간격을 두고 투여한다. 그러나 투여간격은 독성증상의 시작시점, 지속시간, 심각성을 고려하여 결정한다. 투여한 동물의 생존 여부에 대한 확신이 설 때까지는 다음 단계의 투여를 보류해야한다. 모호한 반응을 보이는 경우, 투여간격은 적절하게 조정할 수도 있다. 단일시간 간격을 사용하여 순차적인 투여를 한다면 시험은 단순해진다. 그럼에도 불구하고 투여간격이 시험

중간에 바뀐다고 해서 투여용량 또는 가능도비추정치(likelihood-ratio)를 재계산할 필요는 없다. 시작용량을 결정하기 위해서는, 구조적으로 관련된 물질에 대한 정보, 시험물질에 대한 다른 독성시험의 결과 등 활용 가능한 모든 정보를 이용하여 LD₅₀와 용량-반응 곡선의 기울기를 추정해야한다.

나. 첫 번째 동물은 LD₅₀의 사전예상 값보다 한 단계 낮은 용량을 투여한다. 만약 첫 번째 투여동물이 살아남으면, 두 번째 동물은 한 단계 더 높은 용량의 시험물질을 투여한다. 만약 첫 번째 동물이 사망하거나 빈사상태를 나타내면, 두 번째 동물은 한 단계 낮은 용량의 시험물질을 투여해야 한다. 공비는 1/(용량-반응 곡선의 기울기 추정치)의 antilog로 설정하고 시험기간 동안 이 값을 계속 유지한다(공비 3.2는 기울기 2에 해당).

시험물질의 기울기에 대한 정보가 없을 때에는, 공비는 3.2로 설정한다. 내정값 진행계수(default progression factor)를 이용하여 투여용량을 1.75, 5.5, 17.5, 55, 175, 550, 2000(또는 특별한 규제가 필요한 경우 1.75, 5.5, 17.5, 55, 175, 550, 1750, 5000)의 순서로 선택한다. 시험물질의 치사율을 추정할 수 없는 경우 첫 번째 투여용량은 175 mg/kg으로 시작하는 것을 원칙으로 한다. 대부분의 경우, 이 용량은 치사량에 미치지 못하는 용량이므로 통증과 고통을 감소시킬 수 있다.

만약 시험물질에 대한 실험동물의 내성의 변동성이 클 것으로 예상되는 경우(즉, 기울기가 2.0 미만으로 예상되는 경우), 시험을 시작하기 전에 공비를 log-dose scale에서 내정값인 0.5(즉, 진행계수 3.2)보다 더 큰 값으로 설정해야한다. 마찬가지로 기울기가 클 것으로 예상되는 시험물질인 경우, 공비를 내정값(default)보다 작게 잡아야 한다(시작용량이 175 mg/kg일 때, 1에서 8까지의 기울기를 갖는 각각의 시험물질에 대한 투여용량 진행표는 부록 1에 수록됨).

다. 일정시간 간격(예, 48시간)에 따라 모든 동물의 상태를 고려하면서 투여를 지속하며 다음 시험종료기준 중 하나라도 만족하면 시험을 종료한다.

(a) 연속 3마리의 동물이 상한용량에서 생존하는 경우

(b) 연속적으로 투여한 6마리의 실험동물에서 5차례 역전반응이 일어나는 경우

(c) 첫 번째 역전반응 이후, 최소한 4마리의 동물실험이 더 진행되고 특정한 가능도비추정치가 기준값을 초과하는 경우 (IX-2-라항 및 부록 2 참조. 계산은 첫 번째 역전반응 이후, 4번째 동물을 진행한 후 각각의 투여용량에서 이루어진다)

LD₅₀와 기율기의 다양한 조합을 갖는 경우라 하더라도 시험종료기준 (c)는 첫 번째 역전반응 이후에 4 - 6마리의 실험동물을 사용하면 충족될 수 있다. 그러나 일부 낮은 기율기의 용량-반응 곡선을 갖는 시험물질인 경우는 동물 수가 추가적으로(최대 15마리) 필요할 수도 있다.

라. 시험종료기준이 달성되면, LD₅₀는 시험 종료시점에서 동물결과로부터 계산한다. IX-1-가항 및 IX-2-가항에 설명된 방법을 사용한다.

마. 인도적인 차원에서 안락사 시킨 동물은 시험에서 사망한 동물과 동일한 것으로 처리한다. 만약 동물이 시험 후기에 갑자기 죽고, 동일한 용량 또는 더 높은 용량에서 생존한 다른 동물들이 있는 경우, 투여를 중단하고 이들 동물들도 비슷한 관찰기간 내에 사망이 일어나는 지를 관찰해야 한다. 만약 생존동물들이 이후에 사망하고 모든 투여용량이 LD₅₀보다 높은 것으로 나타나면, 사망을 유발하는 가장 낮은 투여용량보다 최소한 두 단계 낮은 용량에서 시험을 다시 시작해야한다(관찰기간도 늘린다). 왜냐하면 이 시험법은 시작용량이 LD₅₀보다 낮을 때 가장 정확하기 때문이다. 만약 동물이 사망을 일으키는 용량이나 더 높은 용량에서 이후의 실험동물들이 생존하더라도 공비를 변경할 필요는 없다. 왜냐하면, 사망한 동물들은 이후에 생존한 동물의 용량보다 더 낮은 용량에서 사망한 것으로 계산되어져 LD₅₀ 값을 떨어뜨리기 때문이다.

VIII. 관찰

1. 투여 후, 안락사 시키거나 사망한 동물을 제외하고는, 처음 30분 동안은 적어도 한번, 처음 24시간 동안 일정한 시간 간격으로(처음 4시간에 특별한 주의를 요함) 관찰하고, 그 이후 적어도 14일까지는 매일 1회 이상 관찰한다. 그러나 위의 관찰기간을 절대적으로 고정시킬 필요는 없다. 독성반응, 회복시점, 회복기간을 고려하여 필요한 경우에는 관찰기간을 연장할 수 있다. 독성증상이 나타나는 시점과 회복되는 시점이 중요하며, 독성증상이 지연되어 나타나는 경우에 특히 그렇다⁽¹²⁾. 모든 관찰은 동물별로 체계적으로 기록한다.

2. 만약 동물이 지속적으로 독성징후를 보인다면 추가적인 관찰이 필요하다. 이 때 피부, 털, 눈, 점막, 호흡기, 순환기, 활동, 행동양상, 자율 및 중추신경계 등의 변화를 관찰한다. 떨림, 경련, 타액분비, 설사, 무기력, 수면, 혼수 등의 관찰에 주의를 기울인다. 인도적 종료시점 지침문서(Humane Endpoints Guidance Documents)⁽⁸⁾에 수록된 원칙과 기준을 고려한다. 빈사상태의 동물과 극심한

통증 또는 심한 스트레스를 겪고 있는 동물들은 인도적으로 안락사를 시켜야 한다. 동물을 인도적으로 안락사를 시키거나 동물이 사망한 상태로 발견되었을 경우, 가능한 동물의 사망시간을 최대한 정확하게 기록한다.

3. 체중

개별 동물의 체중은 시험물질을 투여하기 직전에 측정하고, 그 다음에는 일주일에 최소한 한번 측정하여 체중변화를 계산하고 기록한다. 시험 종료시에는 생존동물의 체중을 측정하고 인도적으로 안락사 시킨다.

4. 병리

모든 동물(시험 도중에 사망한 동물이나 동물복지 차원에서 시험도중에 안락사 시킨 동물을 포함)은 부검해서 육안병변을 관찰한다. 각각의 동물에 대하여 모든 육안적 병리소견을 기록한다. 첫 번째 투여 이후 24시간 이상 생존한 동물 중에서 육안적으로 병리학적 징후를 보이는 동물들은 부검하여 장기의 조직병리학적 검사를 고려하고, 이를 통하여 유용한 정보를 얻는다.

IX. 결과보고

1. 데이터

각 동물별로 데이터를 제공해야 한다. 또한 모든 데이터를 도표형식으로 정리하여야 한다. 표에는 시험용량별 사용한 전체 동물의 수, 독성징후를 보인 동물의 수⁽¹²⁾, 시험 도중 사망한 동물과 인도적으로 안락사 시킨 동물의 수, 동물별 사망시점, 독성반응과 회복성에 대한 설명과 경과, 부검결과를 기술하며, 공비 및 시작용량 선정에 대한 근거와 이러한 선택을 뒷받침하는 모든 데이터를 제시하여야 한다.

2. 본시험에서 LD₅₀의 계산

가. LD₅₀는 최대가능도추정치(maximum likelihood) 방법을 이용하여⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾ 계산한다. 예외적인 경우는 IX-2-나항을 참고한다. 아래는 최대가능도추정치(가정된 σ 값을 사용하여) 계산을 수행하는데 도움이 되는 통계적 설명이다. 즉시사망, 지연사망, 또는 인도적 안락사 같은 모든 사망이 최대가능도추정치 분석을 위하여 이용된다. Dixon⁽⁴⁾에 의하면 가능도함수는 다음과 같이 쓸 수 있다:

$$L = L_1 L_2 \dots L_n$$

여기서 L 은 μ 와 σ 가 주어졌을 때, 시험결과의 가능도이다, 그리고 n 은 시험한 동물의 총 수이다.

$$L_i = 1 - F(Z_i) \text{ (} i \text{ 번째 동물이 생존하는 경우 적용), 또는}$$

$$L_i = F(Z_i) \text{ (} i \text{ 번째 동물이 사망하는 경우 적용)}$$

여기서

F = 표준정규누적분포

$$Z_i = [\log(d) - \mu] / \sigma$$

d = i 번째 동물에 투여한 용량

σ = log 단위의 용량에서 표준편차(log 표준편차가 아님)

참 LD₅₀ 값의 추정치는 가능도 L 을 최대화하는 μ 값에 의하여 결정된다. (IX-2-다항 참조). 더 나은 일반적 또는 특정 경우의 값이 없다면 σ 값으로 0.5를 사용한다.

나. 어떤 경우는 통계계산이 불가능할 수도 있고 오류가 있는 결과를 낼 수도 있다. 이런 경우, 다음과 같은 특별한 방법을 사용하여 LD₅₀ 값을 결정/보고할 수 있다.

(a) 시험이 VII-3-다항의 기준 (a)에 의하여 종료되었을 때(즉, 경계치의 용량이 반복적으로 사용될 때), 또는 상한용량에서 시험이 종료될 때, LD₅₀는 상한용량보다 높은 것으로 평가한다. 이러한 근거에 의하여 분류가 완료된다.

(b) 사망한 모든 동물이 생존한 모든 동물보다 높은 용량을 투여 받은 경우(또는 실제적으로는 일어나지 않겠지만 만약 모든 생존한 동물들이 모든 사망한 동물보다 높은 용량을 투여 받은 경우), LD₅₀는 생존 동물과 사망한 동물이 투여 받은 용량 사이의 값으로 추정하지만, 이러한 경우 정확한 LD₅₀ 값에 대한 자세한 정보를 제공하지 못한다. 그러나 σ 값이 주어진다면, LD₅₀의 최대가능도추정치를 얻을 수 있다. VII-3-다항의 시험종료기준 (b)가 이런 경우에 해당한다.

(c) 한 용량에서 투여 받은 동물이 생존하거나 사망할 때, 높은 용량에서 나머지 동물이 모두 사망하고, 낮은 용량에서 모두 생존한다면(반대의 경우도 마찬가지), LD₅₀는 그 용량과 일치한다. 만일, 매우 유사물질을 시험하는 경우 투여용량을 좁은 간격으로 진행하여야 한다.

만약 위의 어떤 경우에도 해당하지 않는다면, LD₅₀는 최대가능도추정치 방법으로 계산한다.

다. 최대가능도추정치는 SAS⁽⁹⁾ (예, PROC NLIN) 또는 BMDP⁽¹⁰⁾ (예, AR 프로그램) 컴퓨터 프로그램 패키지를 이용하여 계산할 수 있다. 방법은 참고문헌⁽³⁾의 부록 1D에 설명되어 있으며, 다른 컴퓨터 프로그램도 이용하여 계산할 수 있다. 프로그램 패키지에 대한 일반적인 설명은 ASTM Standard E 1163-87의 부록에 실려 있다⁽¹³⁾. [BASIC 프로그램에서⁽¹³⁾ 사용하는 σ 값은 본 OECD 가이드라인 TG 425의 매개변수를 반영하여 수정이 필요하다]. 이 프로그램의 출력값은 $\log(\text{LD}_{50})$ 및 표준오차이다.

라. VII-3-다항 (c)에 나와 있는 가능도비추정치 시험종료기준은 3개의 측정값을 기반으로 한다. 이 측정값들은 IX-1-가항에 나와 있는 것처럼 각각 다른 μ 값에서의 가능도의 형태를 한다. VII-3-다항의 기준 (a) 또는 (b)를 충족시키지 못하는 6번째 동물 이후, 사용되어진 각각의 실험동물에 대하여 비교가 이루어진다. 가능도비추정치 기준에 대한 방정식은 부록 2에 설명한다. 이런 비교는 예를 들어, 부록 3에서 설명한 것과 같은 컴퓨터 프로그램의 스프레드시트 작업에 의하여 자동화된 방법으로 반복적으로 신속하게 실행할 수 있다. 만약 기준이 충족되면 시험을 종료하고 LD₅₀ 값은 최대가능도추정치 방법에 의해 계산된다.

3. 신뢰구간의 계산

가. 본시험 및 LD₅₀ 계산 후에, LD₅₀에 대한 신뢰구간을 계산할 수 있다. 신뢰구간은 수행한 본시험의 신뢰도와 유용성에 대한 정보를 제공한다. 신뢰구간이 넓으면 계산된 LD₅₀ 값의 불확실성이 크다는 것을 나타내며, LD₅₀ 값의 신뢰도는 낮아지고 추정된 LD₅₀ 값에 대한 유용성은 낮아진다. 신뢰구간이 좁으면 계산된 LD₅₀ 값의 불확실성이 상대적으로 작다는 의미이다. 즉, LD₅₀ 추정치의 신뢰도는 높아지고 추정된 LD₅₀ 값에 대한 유용성은 좋아진다. 이는 본시험을 반복한다면 새로운 LD₅₀ 추정치가 원래의 LD₅₀ 추정치에 가깝고, 이 추정값들은 참 LD₅₀ 값에 가깝다는 의미이다.

나. 본시험의 결과에 따라, 참 LD₅₀ 값의 두 종류의 신뢰구간 값 중 하나를 계산한다.

(a) 최소 3 개의 용량을 시험하고 중간 용량에서 최소 한 마리가 생존하고 한 마리가 죽으면, 프로파일가능도에 기반을 둔(profile-likelihood-based) 계산방식을 이용하여 참 LD₅₀ 값의 95% 신뢰구간을 구한다. 그러나 적은 수의 동물이 이용될 것으로 예상되기 때문에, 실제의 신뢰수준은

일반적으로 정확하지 않다⁽¹⁴⁾. 무작위 시험종료기준은 다양한 기본조건에 반응하는 시험의 전반적인 능력을 개선시키지만, 실제 신뢰수준과 보고된 신뢰수준이 다소 다른 결과를 낳을 수 있다⁽¹⁵⁾.

(b) 만약 특정 용량 또는 그 이하의 용량에서 모든 동물이 생존하고 한 단계 높은 용량에서 모든 동물이 사망하면, 신뢰구간은 모든 동물이 생존한 최고용량을 하한으로 하고 모든 동물이 사망한 용량을 상한으로 한다. 이 구간은 '근사값'으로 표시한다. 이 구간에 대한 정확한 신뢰수준은 계산할 수 없다. 그러나 이러한 종류의 반응은 용량-반응의 기울기가 가파를 때만 일어나기 때문에, 대부분의 경우 참 LD₅₀ 값은 계산된 신뢰구간 안에 있거나 그 구간과 매우 근접하게 있게 될 것으로 예상된다. 이 구간은 상대적으로 좁으며 대부분의 실제 사용에 있어서 충분히 정확한 편이다.

다. 어떤 경우에는 신뢰구간이 무한으로 기록될 수 있다. 즉, 0을 하한으로, 무한대를 상한으로 하거나, 둘다 포함되었을 때 신뢰구간을 무한으로 계산한다. 이런 경우는, 동물들이 모두 사망하거나 모두 생존할 때 일어날 수 있다. 이러한 경우에는 USEPA 또는 OECD에서 개발한 전용 프로그램을 사용하거나, 개발된 특별한 계산방법이 요구되어진다⁽¹⁶⁾. 이 구간에 대한 설명과 전용 프로그램의 특성은 USEPA를 통해 이용 가능한 참고문헌에⁽¹⁷⁾ 기술되어 있다.

4. 시험보고서

시험보고서는 반드시 다음의 정보를 포함하여야 한다.

○ 시험물질

- 물리적 특징, 순도, 그리고 시험과 관련된 물리화학적 특성(이성질체 포함)
- 물질명과 CAS 번호

○ 용매(필요하다면)

- 물이 아닌 용매를 사용했다면, 선택한 이유

○ 실험동물

- 종과 계통
- 동물의 미생물 상태(알려져 있다면)

- 사용한 동물의 수, 주령, 성별(암컷 대신 수컷을 사용한 이유)
- 동물의 공급처, 사육조건, 사료, 기타

○ 시험조건

- 시작용량, 공비 및 후속용량 선정 근거
- 시험물질의 물리적 성상과 시험물질 조제에 대한 상세한 설명
- 투여용량 및 투여시간을 포함한 시험물질 투여에 관한 상세설명
- 사료와 물의 품질에 대한 상세설명(식이형태/공급처, 물 공급처 등 포함)

○ 시험결과

- 체중 및 체중의 변화
- 개체별 동물의 독성, 반응 데이터 및 투여용량의 도표화(즉, 성상, 강도, 영향지속시간 및 치사율을 포함한 독성징후를 보이는 동물)
- 투여를 시작한 날, 투여 후 매주, 그리고 사망 또는 희생된 날의 개별 동물의 체중
- 독성증상 유발시점 및시간에 따른 경과 및 회복성 여부
- 동물의 부검결과 및 각각의 동물에 대한 조직병리학적 소견(가능한 경우)
- LD₅₀ 값
- 시험결과의 통계처리(컴퓨터 작업과정 설명 및 계산값 스프레드시트 도표화)

○ 시험결과의 고찰 및 해석

○ 결론

X. 용어정의

1. **급성경구독성(acute oral toxicity):** 시험물질을 단회 경구투여하거나, 또는 24시간 이내에 다회 경구투여 후 나타나는 이상반응.
2. **지연사망(delayed death):** 동물이 48시간 내에 사망에 도달하지 않거나 빈사상태이다가 이후 14 일 관찰기간 동안 사망.
3. **용량(dose):** 투여한 시험물질의 양. 용량은 중량(g, mg) 또는 실험동물의 단위체중 당 시험물질의 중량(예, mg/kg)으로 표시함.
4. **공비(dose progression factor):** 용량간격계수(dose spacing factor)로도 쓰인다. 시험물질을 투여한 후, 동물이 생존할 경우 용량을 증가시키는 배수 또는 동물이 사망했을 때 용량을 감소시키는 계수를 뜻함. 공비는 1/(용량-반응 곡선의 기울기 추정치)의 antilog를 권장하며, 공비의 내정값은 $3.2 = \text{antilog } 0.5 = \text{antilog } 1/2$ 을 권장함.
5. **GHS (Globally Harmonized Classification System for Chemical Substances and Mixtures, 화학물질과 혼합물의 분류에 관한 국제조화시스템):** OECD (사람건강 및 환경), UN 위험물품운송에 관한 전문가위원회(Committee of Experts on Transport of Dangerous Goods) (이화학적 특성), ILO (위험요소 정보교환)이 공동으로 추진하는 프로그램이며, 화학물질관리기구간 프로그램(Interorganisation Programme for the Sound Management of Chemicals, IOMC)에서 조정함.
6. **임박한 죽음(impending death):** 다음 관찰시간 이전에 빈사상태 또는 사망이 예상될 때를 말함. 설치류에서 이러한 상태를 나타내는 증상은 경련, 옆으로 누운 자세, 누움, 발작 등이다. (자세한 내용은 인도적 종료시점 지침문서(Humane Endpoints Guidance Documents)⁽⁸⁾ 참조).
7. **LD₅₀ (median lethal oral dose):** 경구투여시에 50% 동물이 사망할 것으로 예상되는 통계적으로 도출되는 단일용량을 의미한다. LD₅₀ 값은 실험동물의 단위체중 당 시험물질의 중량(mg/kg)으로 표시한다.
8. **한계용량(limit dose):** 시험에 사용되는 상한한도에 해당하는 용량(2000 또는 5000 mg/kg).

9. **빈사상태(moribund status)**: 생존가망이 없거나 죽어가는 상태(자세한 내용은 인도적 종료시점 지침문서⁽⁸⁾ 참조).

10. **명목표본크기(nominal sample size)**: 실험동물의 총수에서 시리즈 시작부의 같은 반응을 보이는 동물 숫자보다 하나 적은 수, 또는 처음으로 역전반응을 시작하는 한 쌍 직전까지의 동물의 숫자를 빼 수를 의미한다. 예를 들어, X와 O가 서로 반대 결과를 나타내는(예, X는 “48시간 이내에 사망”, O는 “생존”) 다음과 같은 시리즈에서: OOOXXOXO, 실험동물의 총수(또는 통상적인 의미에서 표본크기)는 8이고 명목표본크기는 6이다. 이 예에서는 역전반응 후에 4마리의 동물이 있다. 가이드라인에서 명목표본크기를 나타내는지 또는 총수를 나타내는지 주의해야 한다. 예를 들어 실제로 최대 실험동물의 수는 15마리이다. 시험이 최대숫자에서 정지하면 명목표본크기는 15와 같거나 작다. 명목표본은 (r-1) 번째 동물(역전반응 쌍의 첫 동물)부터 시작한다(아래 역전 참조).

11. **예견된 죽음(predictable death)**: 계획한 시험 종료시점 이전에 사망을 예측할 수 있는 임상징후가 나타나는 경우. 예: 사료나 물에 접근 불가(자세한 내용은 인도적 종료시점 지침문서⁽⁸⁾ 참조).

12. **프로빗(probit)**: “확률통합변환(probability integral transformation)”의 약자. 프로빗 용량-반응 모델은 용량(일반적으로 log-scale)에 대한 예상되는 반응들이 표준정규분포(즉, 평균을 중심으로 표준편차 σ 를 가짐)을 따르도록 만들어주며, 그 분포는 σ 의 역수의 기울기를 갖는 직선처럼 보여진다. 표준정규치사율분포는 대칭분포를 한다: 따라서 평균값은 참 LD_{50} 값 또는 중앙값이다.

13. **역전(reversal)**: 어떤 용량에서 무반응이 관찰되고 다음 용량에서 반응이 관찰될 때, 또는 그 반대 상황(즉, 반응 다음에 무반응)을 의미한다. 따라서 역전은 무반응과 반응의 쌍으로 나타난다. 이런 첫 번째 쌍은 r-1과 r로 매겨진 동물들에서 일어난다.

14. σ : Log 정규곡선의 표준편차이며, 시험물질에 대한 내성의 범위를 설명 (시험물질의 용량이 시험대상의 내성을 초과하면 그 실험동물은 반응할 것으로 예상). 산출된 σ 값은 모든 범위의 용량에 대한 반응에 있어서 실험동물들 사이의 독성반응에 대한 편차를 나타낸다. 기울기와 프로빗 참조.

15. (용량-반응 곡선의) 기울기(Slope (of the dose-response curve)): 용량-반응 곡선이 용량 축에서 상승할 때 생성되는 각도와 관련된 값. 프로빗 분석의 경우, log-scale 상에서 투여용량에 대한 반응들이 프로빗 척도로 분석 되어질 때, 이 곡선은 직선으로 나타나고 그 기울기는 σ 의 역수가 된다. σ 는 실험동물의 내성들에 대한 표준편차이며 이러한 내성들은 정규분포를 따른다고 가정한다. 프로빗과 σ 참조.

16. 시험종료기준(stopping rule): 본 가이드라인에서 시험종료기준은 1) 구체적인 종료기준과 2) 시험종료를 결정하는 모든 기준들의 집합과 같은 뜻으로 쓰인다. 특별히 본시험의 경우, 시험종료기준은 임계값(critical value)값에 대한 비율비교에 의존하며 그 종료기준에 대한 예는 III-3항에서 제시되었다.

XI. 참고문헌

1. Dixon W.J. and A.M. Mood. (1948). A Method for Obtaining and Analyzing Sensitivity Data. *J. Amer. Statist. Assoc.*, 43, 109-126.
2. Dixon W.J. The Up-and-Down Method for Small Samples (1965). *J. Amer. Statist. Assoc.* 60, 967-978.
3. Dixon W.J. (1991). Staircase Bioassay: The Up-and-Down Method. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 15, 47-50.
4. Dixon W.J. (1991) Design and Analysis of Quantal Dose-Response Experiments (with Emphasis on Staircase Designs). Dixon Statistical Associates, Los Angeles CA, USA.
5. Bruce R.D. (1985). An Up-and-Down Procedure for Acute Toxicity Testing. *Fundam. Appl. Tox.*, 5, 151-157.
6. OECD (2000). Guidance Document on Acute Oral Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24.
7. 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 Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, pg 11. [<http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html>].
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. SAS Institute Inc. (1990). SAS/STAT® User's Guide. Version 6, Fourth Ed. or later. Cary, NC, USA.
10. BMDP Statistics Software, Inc. (1990). BMDP Statistical Software Manual. W.J. Dixon, Chief Ed. 1990 rev. or later. University of California Press, Berkeley, CA, USA.

11. 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.
12. Chan P.K. and Hayes A.W. (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.
13. ASTM (1987). E 1163-87, Standard Test Method for Estimating Acute Oral Toxicity in Rats. American Society for Testing and Materials, Philadelphia Pa, USA.
14. Rosenberger W.F., Flournoy N. and Durham S.D. (1997). Asymptotic normality of maximum likelihood estimators from multiparameter response-driven designs. *Journal of Statistical Planning and Inference* 60, 69-76.
15. Jennison C. and Turnbull B.W. 2000. Group Sequential Methods with Application to Clinical Trials. Chapman & Hall/CRC: Boca Raton, FL. USA.
16. Acute Oral Toxicity (OECD Test Guideline 425) Statistical Programme (AOT 425 StatPgm). Version: 1.0, 2001. <http://www.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-document-524-nodirectorate-no-24-6775-8,FF.html>
17. Westat. 2001. Simulation Results from the AOT425StatPgm Program. Report prepared for U.S. E.P.A. under Contract 68-W7-0025, Task Order 5-03.

부록 1. 투여방법: 본시험에서 투여순서

- 1. 용량고저법:** 매회 실험에서 48시간 간격을 두고 한 번에 한 마리씩 동물에 투여한다. 첫 번째 동물은 LD₅₀ 추정치보다 한 단계 낮은 용량을 투여한다. 이런 선택은 최종추정에 있어서 시작용량이 LD₅₀ 값으로부터 멀어지는 경향을 보완하기 위함이다(가이드라인의 III-3항 참조). 투여용량이 각각의 동물에게 순차적으로 조정되어짐에 따라 전반적인 결과양상은 안정될 것으로 예상된다. 아래 3항은 공비의 선택에 대한 안내이다.
- 2. 내정값 용량진행:** 시작용량과 용량간격이 정해지면, 독성학자는 상한(대개 2000 또는 5000 mg/kg)을 포함한 모든 가능한 용량을 기록한다. 상한에 가까운 용량은 용량진행에서 제외한다. 가이드라인 TG 425의 계단식 방법에서는 처음 몇 개의 용량이 자체조절 기능을 하도록 짜여 있다. 양성 편파성 때문에, 물질에 대한 아무런 정보가 없을 때, 시작용량을 175 mg/kg로 하도록 권장한다. 본시험에서 내정값 방식을 이용한다면, 용량은 175 mg/kg에서 시작하고 log-scale에서 0.5의 계수로 간격을 둔다. 사용용량은 1.75, 5.5, 17.5, 55, 175, 550, 2000으로 하고, 특별한 규제가 필요한 경우 1.75, 5.5, 17.5, 55, 175, 550, 1750, 5000으로 한다. 매우 독성이 강한 물질에 대해서는 용량순서를 낮은 값 쪽으로 확대할 필요가 있다.
- 3. 내정값이 아닌 다른 공비가 더 적절하다고 판단되는 경우에는,** 1부터 8까지 정수의 기울기를 갖는 시험물질에 대한 용량진행은 표 1에서 제시된다.

표 1: OECD 가이드라인 TG 425의 용량진행

기울기를 선택하고, 선택한 열의 아래방향으로 읽음. 용량단위는 mg/kg 체중

| 기울기 = | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 0.175* | 0.175* | 0.175* | 0.175* | 0.175* | 0.175* | 0.175* | 0.175* |
| | | | | | | | 0.24 | 0.23 |
| | | | | | 0.275 | 0.26 | | |
| | | | | 0.31 | | | 0.34 | 0.31 |
| | | | 0.375 | | | 0.375 | | |
| | | | | | | | | 0.41 |
| | | | | | 0.44 | | 0.47 | |
| | | 0.55 | | 0.55 | | 0.55 | | 0.55 |
| | | | | | 0.69 | | 0.65 | |
| | | | | | | | | 0.73 |
| | | | 0.81 | | | 0.82 | | |
| | | | | 0.99 | | | 0.91 | 0.97 |
| | | | | | 1.09 | 1.2 | | |
| | | | | | | | 1.26 | 1.29 |
| | 1.75 | 1.75 | 1.75 | 1.75 | 1.75 | 1.75 | 1.75 | 1.75 |
| | | | | | | | 2.4 | 2.3 |
| | | | | | 2.75 | 2.6 | | |
| | | | | 3.1 | | | 3.4 | 3.1 |
| | | | 3.75 | | | 3.75 | | |
| | | | | | 4.4 | | | 4.1 |
| | | | | | | | 4.7 | |
| | | 5.5 | | 5.5 | | 5.5 | | 5.5 |
| | | | | | 6.9 | | 6.5 | |
| | | | | | | | | 7.3 |
| | | | 8.1 | | | 8.2 | | |
| | | | | 9.9 | | | 9.1 | 9.7 |
| | | | | | 10.9 | 12 | | |
| | | | | | | | 12.6 | 12.9 |
| | 17.5 | 17.5 | 17.5 | 17.5 | 17.5 | 17.5 | 17.5 | 17.5 |
| | | | | | | | 24 | 23 |
| | | | | | 27.5 | 26 | | |
| | | | | 31 | | | 34 | 31 |

표 1: 계속

| 기울기 = | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | | | 37.5 | | | 37.5 | | |
| | | | | | 44 | | | 41 |
| | | | | | | | 47 | |
| | | 55 | | 55 | | 55 | | 55 |
| | | | | | | | 65 | |
| | | | | | 69 | | | 73 |
| | | | 81 | | | 82 | | |
| | | | | 99 | | | 91 | 97 |
| | | | | | 109 | 120 | | |
| | | | | | | | 126 | 129 |
| | 175 | 175 | 175 | 175 | 175 | 175 | 175 | 175 |
| | | | | | | | 240 | 230 |
| | | | | | 275 | 260 | | |
| | | | | 310 | | | 340 | 310 |
| | | | 375 | | | 375 | | |
| | | | | | 440 | | | 410 |
| | | | | | | | 470 | |
| | | 550 | | 550 | | 550 | | 550 |
| | | | | | | | 650 | |
| | | | | | 690 | | | 730 |
| | | | 810 | | | 820 | | |
| | | | | 990 | | | 910 | 970 |
| | | | | | 1090 | 1200 | | |
| | | | | | | | 1260 | 1290 |
| | 1750 | 1750 | 1750 | 1750 | 1750 | 1750 | 1750 | 1750 |
| | | | | | | | 2400 | 2300 |
| | | | | | 2750 | 2600 | | |
| | | | | 3100 | | | | 3100 |
| | | | | | | 3750 | 3400 | |
| | | | | | | | | 4100 |
| | 5000 | 5000 | 5000 | 5000 | 5000 | 5000 | 5000 | 5000 |

* 만약 더 낮은 용량이 필요하다면 더 낮은 용량으로 계속 진행한다.

부록 2. 시험종료기준의 가능도비추정치(likelihood-ratio) 계산

1. 가이드라인 VII-3-다항에서 설명한 바와 같이 세 가지 시험종료기준 중 어느 하나라도 먼저 충족하면 본시험을 종료할 수 있다. 어떤 경우든지, 시험종료기준 중 어느 하나도 충족시키지 못하더라도, 15마리의 동물이 사용되면 더 이상의 투여를 중단한다. 표 2-5는, 시험물질에 대한 아무런 정보없이 시험을 시작하는 예들을 설명한다. 여기서 권장 내정값 시작용량 값인 175 mg/kg을 사용하였고, 권장 공비 3.2 또는 half-log 단위를 사용하였다. 이 표들의 형식은 단지 예시일 뿐임을 주의해야한다.
2. 표 2는 한계용량 2000 mg/kg에서 3마리의 동물이 살아남았을 때 본시험을 종료하게 되는 경우를 보여준다. 표 3은 한계용량으로 5000 mg/kg을 사용하였을 때의 비슷한 상황을 보여준다. (이 표들은 한계시험이 적절하지 않은 상황을 제시한 것이다). 표 4는 6마리의 실험동물에서 연속적으로 5차례의 역전반응이 일어나고 시험 종료되는 것을 보여준다. 마지막으로 표 5는 기준 (a)와 기준 (b)를 충족시키지 못한 상황에서, 처음 역전반응이 일어난 후 4마리의 동물들에서 역전반응이 일어났고, 최종적으로 종료기준 (c)를 충족한 사례를 나타낸다.
3. 종료기준 (c)는 역전반응 이후에 4번째 실험동물을 시작으로 각각의 동물들을 실험한 후에 시험종료기준의 가능도비추정치를 평가하도록 요구한다. 세 개의 '시험진행의 측정'을 계산한다. 엄밀히 말하면, 이러한 측정은 가능도비추정치를 나타내며, 그들은 LD₅₀의 최대가능도추정치를 추정하기 위해 요구된다. 이 방법은 가능도추정치를 바탕으로 한 방법에 의해 신뢰구간을 계산하는 것과 밀접하게 관련된다.
4. 이 방법의 기본원리는 충분한 데이터가 모였을 때, LD₅₀의 점추정치는 점추정치의 위 또는 아래의 값보다 실측값에 더 근접하게 되고, 가능도를 사용하여 통계적 지지는 정량화된다. 따라서 세 가지 가능도 값이 계산된다: LD₅₀의 점추정치(어림추정 또는 예에서 용량-평균 추정이라고 불림)에서의 가능도, 점추정치 아래 값에서의 가능도, 점추정치 위 값에서의 가능도. 구체적으로 말하면, 낮은 값은 점추정치를 2.5로 나뉘주고, 높은 값은 점추정치에 2.5를 곱한다.
5. 가능도의 비율을 계산하여 가능도 값을 비교한 다음 가능도비추정치(likelihood-ratio, LR)가 기준값(critical value)을 초과하는지 결정한다. 점추정치에 대한 가능도비추정치가 각각 다른 가능도비추정치들에 대해 2.5배(점추정치에 대하여 상대적으로 강한 통계적 지지를 나타내기 위해 취해진 값)를 초과하면 시험을

종료하게 된다. 따라서 두 개의 가능도비추정치(가)가 계산된다. 즉, 점추정치와 점추정치를 2.5로 나눈 값에 대한 가능도의 비율과, 점추정치와 점추정치를 2.5로 곱한 값에 대한 가능도의 비율이다.

6. 단순히 LD₅₀ 만을 계산할 때는 정규확률함수로 스프레드시트에서 쉽게 수행할 수 있다. 계산법은 표 5에 설명되어 있고 스프레드시트처럼 구성되어 있다. 계산 과정은 상한용량이 5000 mg/kg인 경우를 예로 하였지만, 상한용량이 2000 mg/kg인 경우에도 동일한 방법으로 수행할 수 있다. 다른 방법으로는 동물 데이터 입력창과, LD₅₀와 신뢰구간의 계산에 필요한 계산식을 갖춘 전용 소프트웨어를 사용할 수 있다. 이 소프트웨어는 OECD와 US EPA의 웹 사이트에서 다운로드할 수 있다. 표 6은 이 소프트웨어의 스크린 이미지를 보여준다.

7. 상한용량 5000 mg/kg를 이용한 가상 예(표 5)

가. 상한용량 5000 mg/kg를 이용한 가상 예에서, 가능도비추정치(LR) 시험종료기준은 9마리의 동물을 시험한 후에 충족되었다. 첫 번째 '역전반응'은 3번째 실험동물에서 일어났다. 역전반응 후, 4마리의 동물에 대한 시험이 끝난 후에 가능도비추정치 시험종료기준을 평가한다. 본 예에서, 첫 번째 역전반응 이후 4번째 동물은 실제적으로는 7번째 동물이다. 따라서 본 예에서 스프레드시트 계산은 7번째 동물의 시험이 끝난 후에만 필요하고 그 때 데이터를 입력할 수 있다. 따라서 가능도비추정치 시험종료기준은 7번째 동물, 8번째 동물, 9번째 동물의 시험이 끝난 후에 평가되어진다. 본 예에서, 가능도비추정치 시험종료기준은 9번째 동물이 실험된 후 처음으로 충족되었다.

나. 동물별로 용량-반응 정보를 입력

1열: Step에 1-15의 번호를 차례로 입력. 실험동물의 수는 15마리를 초과하지 않는다.

2열: 각각의 동물이 시험될 때마다 I를 입력

3열: i 번째 동물이 투여 받은 용량을 입력

4열: 동물이 반응하였는지(X로 표시) 또는 무반응인지(O로 표시) 입력

다. 명목표본크기와 실제표본크기

명목표본은 역전반응을 나타낸 두 동물(여기에서는 두 번째와 세 번째 동물)과 그 후의 시험에 사용된 동물들로 구성된다. 여기에서 5열은 그 동물들이 명목표본에 해당하는지 아닌지를 나타낸다.

명목표본크기(명목 n)는 16행에 표시하였다. 명목표본크기는 명목표본의 동물

숫자이다. 본 예에서, 명목 n은 8이다. 실제표본크기는 17행에 표시하였다.

라. LD₅₀의 어림추정치

현재 명목표본의 동물들에 대한 용량기하평균값은 LD₅₀의 어림추정치로 사용되어진다. 본 표에서, 이것을 “용량-평균 추정치(dose-averaging estimator)”이라고 부른다. 이 수치는 동물시험이 진행될 때마다 갱신된다. 이 평균은 처음 시작용량을 잘못 선택으로 인해 처음부터 반응이 계속 이어지거나 또는 처음부터 무반응이 계속 이어지는 경우를 감안하여 명목표본에 한정된다. (그러나 아래와 같이 최종 LD₅₀의 가능도를 계산할 때는 모든 동물들의 결과를 이용한다). n수들에 대한 기하평균값은 n수의 곱에 대한 1/n의 제곱이라는 점을 기억한다.

용량-평균 추정치는 18행에 나타낸다

(예, $(175 \cdot 550 \cdot \dots \cdot 1750)^{1/8} = 1292.78$).

19행은 18행의 값에 대한 상용로그(log₁₀)값을 나타낸다

(예, $\log_{10}1292.8 = 3.112$).

마. 어림추정 LD₅₀의 가능도

1) 가능도는 LD₅₀ 또는 다른 매개변수의 추정치를 데이터가 얼마나 강력하게 뒷받침하느냐 하는 통계적인 추정값이다. 가능도비추정치는 그 데이터가 LD₅₀에 대한 다른 추정치에 대해 얼마나 잘 뒷받침 하는지를 파악하는데 사용할 수 있다.

2) 8열에는 ‘라’ 항에 나온 어림추정 LD₅₀의 가능도를 계산한다. 가능도(21행)는 각 동물의 가능도기여의 곱이다(가이드라인의 IX-2-가항 참조). i 번째 동물의 가능도기여는 L_i 로 표시한다.

3) 7열에는 용량 d 에 대한 반응확률의 추정치(P 로 표시)를 입력한다. P_i 는 용량-반응 곡선으로부터 계산한다. 프로빗 용량-반응 곡선의 매개변수들은 기울기와 LD₅₀이기 때문에 각각의 변수들에 대한 값들이 요구된다. 따라서 각각의 매개변수를 위한 값이 필요하다는 것을 명심한다. LD₅₀는 18행의 용량-평균 추정치를 이용한다. 본 예에서 기울기는 내정값으로 2를 사용하였다. 반응확률 P 를 계산하기 위해 다음 단계를 이용할 수 있다.

① 용량 d 의 상용 log 값을 계산한다(6열).

② 각각의 동물에 대하여 다음 공식을 이용하여 Z_i 로(표에는 제시되지 않음)

표시되는 z -점수를 계산한다.

$$\sigma = 1/\text{기울기}$$

$$Z_i = (\log_{10}(d) - \log_{10}(LD_{50}))/\sigma$$

예를 들어 첫 번째 동물에서는(1행)

$$\sigma = 1/2$$

$$Z_1 = (2.243 - 3.112)/0.500 = -1.738$$

③ i 번째 용량에 대한 추정반응확률(estimated response probability)은

$$R = F(Z_i)$$

여기서 F 는 표준정규분포(즉, 평균 0과 분산 1를 갖는 정규분포)를 위한 누적분포함수이다.

예를 들어(1행)

$$R_1 = F(-1.738) = 0.0412$$

함수 F (또는 매우 근접한 것)는 보통은 통계표에서 정규분포인 경우에 주어지지만, 스프레드시트 함수로 널리 쓰인다. 이 함수의 이름은 여러 개인데, 예를 들면 Lotus 1-2-3에서는 @NORMAL 함수⁽¹⁾와 Excel에서는 @NORMDISRT 함수⁽²⁾이다. 사용자가 소프트웨어의 함수를 올바르게 사용했는지 확인하려면, 예를 들어 $F(1.96) \approx 0.975$ 또는 $F(1.64) \approx 0.95$ 와 같이 잘 알려진 값으로 확인한다.

4) 8열에서는 가능도기여의 자연 \log ($\ln(L_i)$)를 계산한다. L_i 는 i 번째 동물에서 실제로 관찰되는 단순한 반응확률이다.

$$\text{반응 동물: } \ln(L_i) = \ln(R)$$

$$\text{무반응 동물: } \ln(L_i) = \ln(1 - R)$$

다른 곳에서는 밑이 10(상용)인 \log 를 사용하였지만 여기서는 자연 \log (\ln)를 사용한다는 것에 주의한다. 이러한 선택은 이런 종류의 작업에서 보통 일어나는 일이다.

위 단계의 작업을 각각의 동물에 대하여 시행한다. 마지막으로:

20행: 8열의 log-가능도기여를 더한다.

21행: 20행의 log-가능도 값에 지수함수를 적용하여 가능도를 계산한다 (예, $\exp(-3.389) = e^{-3.389} = 0.0337$).

바. 어림추정의 위와 아래의 두 용량에 대한 가능도를 계산

만약 데이터가 정확한 추정치이고, 그 추정치가 LD₅₀에 합당한 추정치라면 이 추정치에서 떨어진 값들의 가능도들보다 상대적으로 가능도는 높다고 예상할 수 있다. 용량-평균 추정치(1292.8, 18행)에 대한 가능도와 용량-평균 추정치(1292.8, 18행)에 2.5 배를 곱하거나 나누어 얻어진 값들(즉, 1292.8*2.5 및 1292.8/2.5)에 대한 가능도를 비교한다. 계산(9-12열에 표시)은 위에 설명한 것과 비슷한 방식으로 진행한다. 단지 다른 것은 1292.8 대신에 517.1(=1292.8/2.5)과 3232.0(=1292.8*2.5)을 LD₅₀로 사용한다. 가능도와 log-가능도는 20-21행에 표시하였다.

사. 가능도비추정치의 계산

세 개의 가능도 값(21행)으로부터 두 개의 가능도비추정치(likelihood ratio, LR)를 계산한다(22행). 추정치 1292.8을 뒷받침하는 통계데이터를 517.1 및 3232.0을 뒷받침하는 통계데이터와 비교하기 위해서 가능도비추정치를 이용한다. 따라서, 두 개의 가능도비추정치는 다음과 같다:

$$\begin{aligned} LR1 &= [1292.8\text{의 가능도}] / [517.1\text{의 가능도}] \\ &= 0.0337 / 0.0080 \\ &= 4.21 \end{aligned}$$

또한,

$$\begin{aligned} LR2 &= [1292.8\text{의 가능도}] / [3232.0\text{의 가능도}] \\ &= 0.0337 / 0.0098 \\ &= 3.44 \end{aligned}$$

아. 가능도비추정치가 기준값(critical value)을 초과하는지 결정

높은 가능도비추정치는 LD₅₀의 점추정에 대하여 상대적으로 높은 통계적 지지를 나타낸다. '사' 항에서 계산한 두 개의 가능도비추정치(4.21과 3.44)는 기준

가능도비추정치인 2.5를 초과한다. 따라서 가능도비추정치 시험종료기준이 충족되었고 시험은 종료된다. 이것은 24행에 TRUE로 표시되고 LR 기준이 충족되었다는 것이 스프레드시트 상단에 표시되었다.

참고문헌

1. Lotus Development Corporation (1999). Lotus[®] 1-2-3. Version 9.5, Millenium Edition. Cambridge, MA, USA.
2. Microsoft Corporation (1985-1997). Microsoft[®] Excel Version 5.0 or later. Seattle, WA, USA.

표 2: 2000 mg/kg의 용량을 사용할 때 시험종료기준 (a)의 예

▲ Stop after animal #5 because 3 animals survive at limit of 2000 mg/kg (#3-#5).

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|--|--------------------------|------|-----------------------------------|-----------------------------|---------------|---|---|--------------------------------|---|--------------------------------|---|
| Step | (I)include; (E)xclude | Dose | (X)response (O)non-resp. OK | Included in nominal n | log10 Dose | LD50 = Prob. of response | #DIV/0! likelihood contribution. (ln Li) | LD50 = Prob. of response | #DIV/0! likelihood contribution. (ln Li) | LD50 = Prob. of response | #DIV/0! likelihood contribution. (ln Li) |
| 1 | I | 175 | O | no | 2.2430 | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! |
| 2 | I | 550 | O | no | 2.7404 | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! |
| 3 | I | 2000 | O | no | 3.3010 | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! |
| 4 | I | 2000 | O | no | 3.3010 | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! |
| 5 | I | 2000 | O | no | 3.3010 | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! |
| 6 | E | | | | - | Ignore all calculation cells. No reversal in direction of response. | | | | | |
| 7 | E | | | | - | - | - | - | - | - | - |
| 8 | E | | | | - | - | - | - | - | - | - |
| 9 | E | | | | - | - | - | - | - | - | - |
| 10 | E | | | | - | - | - | - | - | - | - |
| 11 | E | | | | - | - | - | - | - | - | - |
| 12 | E | | | | - | - | - | - | - | - | - |
| 13 | E | | | | - | - | - | - | - | - | - |
| 14 | E | | | | - | - | - | - | - | - | - |
| 15 | E | | | | - | - | - | - | - | - | - |
| Nominal Sample size = | | | | 0 | | | | | | | |
| Actual number tested = | | | | 5 | | | | | | | |
| Calculated maximum likelihood estimate of LD50 = | | | | none | | | | | | | |

Maximum Likelihood Calculations cannot be completed. LD50 is greater than 2000 mg/kg.

표 3: 5000 mg/kg의 용량을 사용할 때 시험종료기준 (a)의 예

▲ Stop after animal #6 because 3 animals survive at limit of 5000 mg/kg (#4-#6).

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|--|--------------------------|------|-----------------------------------|-----------------------------|---------------|---|---|--------------------------------|---|--------------------------------|---|
| Step | (I)include; (E)xclude | Dose | (X)response (O)non-resp. OK | Included in nominal n | log10 Dose | LD50 = Prob. of response | #DIV/0! likelihood contribution. (ln Li) | LD50 = Prob. of response | #DIV/0! likelihood contribution. (ln Li) | LD50 = Prob. of response | #DIV/0! likelihood contribution. (ln Li) |
| 1 | I | 175 | O | no | 2.2430 | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! |
| 2 | I | 550 | O | no | 2.7404 | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! |
| 3 | I | 1750 | O | no | 3.2430 | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! |
| 4 | I | 5000 | O | no | 3.6990 | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! |
| 5 | I | 5000 | O | no | 3.6990 | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! |
| 6 | I | 5000 | O | no | 3.6990 | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! |
| 7 | E | | | | - | Ignore all calculation cells. No reversal in direction of response. | | | | | |
| 8 | E | | | | - | - | - | - | - | - | - |
| 9 | E | | | | - | - | - | - | - | - | - |
| 10 | E | | | | - | - | - | - | - | - | - |
| 11 | E | | | | - | - | - | - | - | - | - |
| 12 | E | | | | - | - | - | - | - | - | - |
| 13 | E | | | | - | - | - | - | - | - | - |
| 14 | E | | | | - | - | - | - | - | - | - |
| 15 | E | | | | - | - | - | - | - | - | - |
| Nominal Sample size = | | | | 0 | | | | | | | |
| Actual number tested = | | | | 6 | | | | | | | |
| Calculated maximum likelihood estimate of LD50 = | | | | none | | | | | | | |

Maximum Likelihood Calculations cannot be completed. LD50 is greater than 5000 mg/kg.

표 4: 시험종료기준 (b)의 예

▲ Stop after animal #7 because 5 reversals in 6 consecutive animals tested (#2-#7).

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|--|--------------------------|------|-----------------------------|-----------------------------|--|---|---|--------------------------------|---|--------------------------------|---|
| Step | (I)include; (E)xclude | Dose | (X)response (O)non-resp. | Included in nominal n | log10 Dose | LD50 = Prob. of response | 31.0 likelihood contribution (ln Li) | LD50 = Prob. of response | 12.4 likelihood contribution (ln Li) | LD50 = Prob. of response | 77.6 likelihood contribution (ln Li) |
| 1 | I | 175 | X | no | 2.2430 | 0.9335 | -0.0688 | 0.9892 | -0.0108 | 0.7602 | -0.2742 |
| 2 | I | 55 | X | yes | 1.7404 | 0.6905 | -0.3703 | 0.9020 | -0.1031 | 0.3826 | -0.9607 |
| 3 | I | 17.5 | O | yes | 1.2430 | 0.3095 | -0.3703 | 0.6174 | -0.9607 | 0.0980 | -0.1031 |
| 4 | I | 55 | X | yes | 1.7404 | 0.6905 | -0.3703 | 0.9020 | -0.1031 | 0.3826 | -0.9607 |
| 5 | I | 17.5 | O | yes | 1.2430 | 0.3095 | -0.3703 | 0.6174 | -0.9607 | 0.0980 | -0.1031 |
| 6 | I | 55 | X | yes | 1.7404 | 0.6905 | -0.3703 | 0.9020 | -0.1031 | 0.3826 | -0.9607 |
| 7 | I | 17.5 | O | yes | 1.2430 | 0.3095 | -0.3703 | 0.6174 | -0.9607 | 0.0980 | -0.1031 |
| 8 | E | | | | - | - | - | - | - | - | - |
| 9 | E | | | | - | - | - | - | - | - | - |
| 10 | E | | | | - | - | - | - | - | - | - |
| 11 | E | | | | - | - | - | - | - | - | - |
| 12 | E | | | | - | - | - | - | - | - | - |
| 13 | E | | | | - | - | - | - | - | - | - |
| 14 | E | | | | - | - | - | - | - | - | - |
| 15 | E | | | | - | - | - | - | - | - | - |
| Nominal Sample size = | | | | 6 | | | | | | | |
| Actual number tested = | | | | 7 | | | | | | | |
| Dose-averaging estimator | | | | 31.02 | | | | | | | |
| log10 = | | | | 1.492 | | | | | | | |
| log-likelihood sums: | | | | | | | -2.2906 | | -3.2021 | | -3.4655 |
| likelihoods: | | | | | | | 0.1012 | | 0.0407 | | 0.0313 |
| likelihood ratios: | | | | | | | | | 2.4880 | | 3.2378 |
| Individual ratios exceed critical value? | | | | critical= | 2.5 | Automated calculation; not relevant to this case. | | FALSE | | TRUE | |
| Both ratios exceed critical value? | | | | | | | | FALSE | | | |
| Calculated maximum likelihood estimate of LD50 = | | | | 29.6 | Final estimate obtained from Maximum Likelihood Calculations | | | | | | |

표 5: 시험종료기준 (c)의 예

▲ Stop when LR criterion is first met, here at animal #9.
Check LR criterion starting at animal #6.

| Assumed slope | 2 | sigma = | 0.5 | Parameters of convergence criterion | | | | | | | | |
|--|--------------------------|---------|-----------------------------|-------------------------------------|--|-------------------|--------------------------------|---|--------------------------------|--|--------------------------------|---|
| Result: The LR criterion is met | | | | critical LR | 2.5 | | | | | | | |
| | | | | factor of LD50 | 2.5 | | | | | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | |
| Step | (I)include; (E)xclude | Dose | (X)response (O)non-resp. | Included in nominal n | log10 Dose | Contrib.to DAE | LD50 = Prob. of response | 1292.8 likelihood contribution (ln Li) | LD50 = Prob. of response | 517.1 likelihood contribution (ln Li) | LD50 = Prob. of response | 3232.0 likelihood contribution (ln Li) |
| 1 | I | 175 | O | no | 2.2430 | 0.0000 | 0.0412 | -0.0421 | 0.1733 | -0.1903 | 0.0057 | -0.0057 |
| 2 | I | 550 | O | yes | 2.7404 | 2.7404 | 0.2289 | -0.2600 | 0.5214 | -0.7368 | 0.0620 | -0.0640 |
| 3 | I | 1750 | X | yes | 3.2430 | 3.2430 | 0.6037 | -0.5046 | 0.8552 | -0.1564 | 0.2971 | -1.2138 |
| 4 | I | 550 | O | yes | 2.7404 | 2.7404 | 0.2289 | -0.2600 | 0.5214 | -0.7368 | 0.0620 | -0.0640 |
| 5 | I | 1750 | X | yes | 3.2430 | 3.2430 | 0.6037 | -0.5046 | 0.8552 | -0.1564 | 0.2971 | -1.2138 |
| 6 | I | 550 | O | yes | 2.7404 | 2.7404 | 0.2289 | -0.2600 | 0.5214 | -0.7368 | 0.0620 | -0.0640 |
| 7 | I | 1750 | O | yes | 3.2430 | 3.2430 | 0.6037 | -0.9257 | 0.8552 | -1.9323 | 0.2971 | -0.3525 |
| 8 | I | 5000 | X | yes | 3.6990 | 3.6990 | 0.8800 | -0.1279 | 0.9756 | -0.0247 | 0.6477 | -0.4344 |
| 9 | I | 1750 | X | yes | 3.2430 | 3.2430 | 0.6037 | -0.5046 | 0.8552 | -0.1564 | 0.2971 | -1.2138 |
| 10 | E | | | | - | 0.0000 | - | - | - | - | - | - |
| 11 | E | | | | - | 0.0000 | - | - | - | - | - | - |
| 12 | E | | | | - | 0.0000 | - | - | - | - | - | - |
| 13 | E | | | | - | 0.0000 | - | - | - | - | - | - |
| 14 | E | | | | - | 0.0000 | - | - | - | - | - | - |
| 15 | E | | | | - | 0.0000 | - | - | - | - | - | - |
| Nominal Sample size = | | | | 8 | | | | | | | | |
| Actual number tested = | | | | 9 | | | | | | | | |
| Dose-averaging estimator | | | | 1292.78 | | | | | | | | |
| log10 = | | | | 3.112 | | | | | | | | |
| log-likelihood sums: | | | | | | | | -3.3894 | | -4.8270 | | -4.6260 |
| likelihoods: | | | | | | | | 0.0337 | | 0.0080 | | 0.0098 |
| likelihood ratios: | | | | | | | | | | 4.2104 | | 3.4436 |
| Individual ratios exceed critical value? | | | | critical= | 2.5 | | | TRUE | | TRUE | | |
| Both ratios exceed critical value? | | | | | | | | TRUE | | | | |
| Calculated maximum likelihood estimate of LD50 = | | | | 1329.6 | Final estimate obtained from Maximum Likelihood Calculations | | | | | | | |

표 6: OECD 가이드라인 TG 425의 전용 소프트웨어에서 시험종료기준 (c)의 예

The screenshot displays the AOT425StatPgm software window. The title bar reads 'AOT425StatPgm'. The menu bar includes 'New Test', 'Load Data', 'Save Data', 'Get Report', 'Options', 'About AOT425', and 'Exit'. The main interface has a teal background and contains the following elements:

- Test / Substance:** Example of stopping criterion in Paragraph 33 (c) of OECD TG 425
- Test Type:** Main
- Limit Dose:** 5000
- Assumed values at start of the main test:** LD50: Default, Sigma: 0.5
- Table:** A table with 6 columns: Test Seq., Animal ID, Dose mg/kg, Short-term Outcome, Long-term Outcome, and Program's Data Entry Messages. The table contains 15 rows of data.
- Message Box:** A scrollable text area at the bottom containing the following text:

The main test is complete.
 Stopping criteria met: LR criterion.
 Estimated LD50 = 1750 (The one dose with partial response). 95% PL Confidence interval is 651.9 to 2690.

| Test Seq. | Animal ID | Dose mg/kg | Short-term Outcome | Long-term Outcome | Program's Data Entry Messages |
|-----------|-----------|-------------|--------------------|-------------------|-------------------------------|
| 1 | | 175 | 0 | 0 | |
| 2 | | 550 | 0 | 0 | |
| 3 | | 1750 | X | X | |
| 4 | | 550 | 0 | 0 | |
| 5 | | 1750 | X | X | |
| 6 | | 550 | 0 | 0 | |
| 7 | | 1750 | 0 | 0 | |
| 8 | | 5000 | X | X | |
| 9 | | 1750 | X | X | |
| 10 | | Stop Dosing | | | |
| 11 | | | | | |
| 12 | | | | | |
| 13 | | | | | |
| 14 | | | | | |
| 15 | | | | | |

부록 3. 동물시험을 수행하지 않고 LD₅₀가 2000 mg/kg를 초과할 것으로 예상되는 시험물질의 분류 기준

1. 위험물 Category 5의 기준은 급성독성 위해도가 상대적으로 낮지만 특정 상황에서 취약한 인구집단에 위험이 될 수 있는 시험물질을 식별하는데 목적이 있다. 이 물질들은 경구 또는 경피 LD₅₀가 2000-5000 mg/kg 범위이고 다른 경로인 경우에도, 이와 동등한 용량으로 예상된다. 다음과 같은 경우 시험물질은 2000 mg/kg < LD₅₀ < 5000 mg/kg (GHS Category 5)로 규정된 위험성 범주로 분류한다;

가. 만약 LD₅₀가 Category 5의 범위 안에 있다는 신뢰성 있는 증거가 이미 확보되어 있을 경우; 동물시험 또는 사람에 대한 독성 연구자료에 근거하여 사람의 건강에 급성적인 문제를 일으킬 것으로 나타나는 경우.

나. 데이터의 외삽, 추정 또는 측정을 통하여 더 높은 위험성 범주로 할당되는 것이 보장되지 않고, 이에 더하여:

- 인간에게서 현저한 독성이 있다는 신뢰성 있는 정보가 있는 경우
- 경구투여로 Category 4 값까지 시험했을 때 사망이 관찰되는 경우
- 전문가의 판단으로, Category 4 값까지 시험하였을 때, 설사, 털세움, 더러움을 제외한 현저한 독성의 임상증상을 확인한 경우
- 다른 동물시험에서 현저한 급성증상을 일으킬 잠재력이 있다는 정보를 전문가들이 확증하였을 경우

2. 2000 mg/kg 이상의 용량 시험:

동물복지를 고려하여 Category 5 범주에서 동물시험을 하는 것을 권장하지 않으며, 시험의 결과가 인간의 건강을 보호하는데 직접적이 관련이 있을 것이라는 강한 확신을 갖는 경우에는 시험을 고려한다.

화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인(VII)

| | |
|------|---|
| 발행일 | 2015월 9월 |
| 발행처 | 식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 바이오생약심사부 화장품심사과 |
| 발행위원 | 이윤제, 손수정, 이정표, 김정근, 김태성, 김주환, 김도정, 김선희, 강진욱, 현성예, 조미란, 박소영, 이정선, 고경욱, 안일영 |
