

등록번호

안내서-0757-01

화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인 (IX) (민원인 안내서)

- 인체각막유사 상피모델을 이용한 안자극시험법

2016. 9.



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

독성평가연구부 특수독성과

지침서·안내서 제·개정 점검표

명칭

화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인(IX) (민원인 안내서)

아래에 해당하는 사항에 체크하여 주시기 바랍니다.

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

이 안내서는 화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인(IX)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 2016년 9월 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	B1-2016-4-001	2016.9	화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인(IX) 제정
2	안내서-0757-01	-	「식약처 지침서등의 관리에 관한 규정」 개정에 따른 일괄 재분류 (규제개혁담당관실-3761호,2017.5.16)

목 차

I. 개요	1
II. 초기 고려사항과 제한점	3
III. 시험원리	7
IV. 숙련도 확인	8
V. 시험방법	12
VI. RhCE 시험법 구성요소	12
VII. 시험결과 및 보고	25
VIII. 용어정의	30
IX. 참고문헌	36
부록 1. VRM SOP에 근거하여 직접적인 MTT 환원제나 색 간섭 물질을 구별하고 관리하는 순서도	43
부록 2. RhCE 조직모델에서 추출된 MTT 포르마잔 정량을 위한 HPLC/UPLC-분광광도계 관리의 주요 측정인자와 허용기준	44

I. 개요

본 가이드라인은 화장품 독성시험 중 안점막자극시험을 대체할 수 있는 동물대체 시험법으로 식품의약품안전처에서 수행한 연구사업결과와 관련 업계의 이해관계자 및 산·학·연 전문가의 의견을 반영하여 현재의 과학기술수준에서 화장품 독성시험 동물대체시험법에 대한 일반적인 원칙과 방법을 제시하고자 마련하였으며, 향후 과학기술의 발전에 따라 추가적으로 수정될 수 있다. 또한, 본 가이드라인은 법적 효력이 있는 사항이 아니며, 개별 사항에 따라 다르게 해석할 수 있다.

1. “심한 안 손상(Serious eye damage)”은 안점막에 시험물질 적용 후 눈에 나타나며 물질 적용 후 21일 안에 완전히 회복되지 않는 안조직 손상 또는 심각한 시력 감퇴를 나타낸다 [UN의 화학물질의 분류 및 표시에 관한 국제조화시스템(UN GHS)에 의해 정의]⁽¹⁾. 또한 UN GHS에 따르면, “안 자극(eye irritation)”은 안점막에 시험물질 적용 후 나타나는 눈의 변화로서 적용 후 21일 안에 완전히 회복 할 가능성을 나타낸다. 심한 안 손상을 유도하는 시험물질은 UN GHS Category 1로 분류되고 안 자극 유도 시험물질은 UN GHS Category 2로 분류된다. 안 자극 또는 심한 안 손상으로 분류되지 않는 시험물질 즉, UN GHS Category 1 또는 2(2A 또는 2B)의 분류 조건을 충족하지 않는 것은 ‘UN GHS No Category’로 지칭한다.
2. 심한 안 손상/안 자극의 평가는 일반적으로 실험동물을 이용한 OECD(경제협력개발기구) 가이드라인(TG) 405번이 활용되고 있다⁽²⁾. 그러나 이 가이드라인의 부속서에 의하면 동물의 고통과 통증을 감소시키거나 회피하기 위해 물질의 심한 안 손상/안 자극 가능성을 판별하는데 있어 순차적 시험전략의 사용하도록 권고하고 있으며, 과학적으로 검증된 유효한 체외(*in vitro*)시험법을 이용하여 물질의 심한 안 손상/안 자극 가능성을 판별하도록 하고 있다⁽²⁾.
3. 이 시험법 가이드라인은 UN GHS에 따른 안 자극 또는 심한 안 손상에 대한 분류 및 표시가 필요하지 않은 시험물질(화합물 및 혼합물)을 식별하는 생체 외(*in vitro*) 시험법을

설명한다. 본 시험지침은 인체 각막 상피와 조직학적, 형태학적, 생화학적, 생리학적 특성을 매우 유사하게 모사한 인체각막유사상피 모델(RhCE)을 이용한다. 참고로 물질의 심한 안 손상 또는 안 자극 평가항목을 다루는 OECD 생체 외(*in vitro*)시험법 가이드라인으로는 TG 437⁽³⁾, 438⁽⁴⁾, 460⁽⁵⁾ 과 491⁽³²⁾이 사용되고 있다.

4. 본 가이드라인은 시험계로서 상용화된 RhCE 조직 모델을 적용한 EpiOcularTM Eye Irritation Test (EIT)에 대한 시험법이다. EpiOcularTM EIT은 UN GHS⁽¹⁾에 따른 안 자극과 심한 안 손상의 분류와 표시가 필요하지 않은 시험물질(화합물 및 혼합물)을 적절히 판별하기 위한 평가법으로서 과학적으로 타당함이 증명되었다⁽⁶⁾⁽⁷⁾⁽⁸⁾⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾. 따라서 본 가이드라인에서 EpiOcularTM EIT를 검증된 참고시험법(Validated Reference Method, VRM)으로 지칭한다.

5. 다양한 화학물질들에 의해 유발될 수 있는 모든 범위의 심한 안 손상/안 자극 반응을 예측하기 위해 하나의 생체 외(*in vitro*)시험법으로는 생체 내(*in vivo*) Draize eye test를 완전히 대체할 수 없다는 것이 일반적인 견해이다⁽²⁾⁽¹²⁾. 하지만, 상향식/하향식 접근방식과 같이 시험전략 내에 여러 개의 대체 시험법들을 전략적으로 조합하여 수행하면 Draize eye test를 완전히 대체할 수 있을 것으로 여겨진다⁽¹³⁾. 상향식 접근방식(Bottom-Up approach)⁽¹³⁾은 기존 정보에 근거하여 시험물질 분류 시 충분히 안 자극을 일으키지 않는 것으로 예상되는 경우를 위해 설계되었으며, 반면에 하향식 접근방식(Top-Down approach)⁽¹³⁾은 기존 정보에 근거하여 화학물질이 심한 안손상을 야기할 것으로 예상되는 경우를 위해 고안되었다. EpiOcularTM EIT은 상향적/하향적 접근법과 같은 시험전략 하에서 추가시험 없이 UN GHS에 따른 안 자극 또는 심한 안 손상에 대한 분류가 요구되지 않는 물질(UN GHS No Category)⁽¹⁾을 식별할 때 권장되며, 이 시험법은 상향식 접근방식의 첫 단계 시험법 또는 하향식 접근방식의 마지막 단계 중 하나로 활용될 수 있다⁽¹³⁾. 그러나 EpiOcularTM EIT은 UN GHS Category1(심한 안 손상)과 UN GHS Category2(안 자극)을 구별하는 목적으로 개발되지 않았다. 이 구별을 위해서는 추가적 단계의 시험전략이 필요할 것이다⁽¹³⁾. 따라서 안

자극/심한 안 손상에 대한 명확한 분류가 필요한 시험물질이라면 EpiOCular™ EIT과 함께 추가시험(생체 외 또는 생체 내, 예; TG 437, 438, 460, 또는 490)을 수행해야 할 것이다.

6. 본 시험법 가이드라인은 RhCE 조직 모델에서 MTT 분석법으로 측정되는 시험물질의 세포독성 유발 정도에 근거하여 시험물질의 눈에 대한 위험성을 평가하는 방법을 설명한다⁽¹⁴⁾(III-3 항 참조). 시험물질 노출 후 RhCE 조직의 생존율은 음성대조물질로 처리된 조직과 비교해서 결정되며(%생존율) 이 때 얻어진 생존율을 근거로 시험물질의 눈에 대한 위험성을 예측한다.
7. 유사시험법평가기준(Performance Standards)⁽¹⁵⁾은 OECD 지침서 34⁽¹⁶⁾의 원칙에 따라 EpiOCular™ EIT과 유사한 방법으로서 새롭게 또는 변형된 생체 외 RhCE 기반 시험방법들에 대한 검증에 이용될 것이며, 이러한 유사시험법들은 본 가이드라인의 개정에 사용될 것이다. 유사시험법평가기준에 따라 검증된 시험방법들로 부터의 결과는 상호 데이터 수용(Mutual Acceptance of Data: MAD)으로 인정될 것이다.

II. 초기 고려사항과 제한점

1. 본 시험법 가이드라인은 초대배양 인체유래 상피 각질세포를 이용하여 제작되어 상용화된 3차원 인체각막유사 모델(EpiOCular™ OCL-200)을 기반으로 하며, 생체 내 각막 상피의 3차원 구조와 유사하며 인체유래 세포를 이용해서 만들어진⁽¹⁷⁾. 더욱이, 본 시험지침서는 시험물질의 안 노출 시 전반적인 생체 내의 심한 안 손상/안 자극 반응(즉, 각막을 통한 시험물질의 투과와 세포와 조직의 손상 발생)을 결정짓는 중요한 기전적 단계를 직접적으로 다룬다. 세포 손상은 여러 작용기전에 의해 일어날 수 있다(III-2 항 참조). 하지만 조직 손상의 원인이 되는 물리화학적 과정들과는 상관없이, 세포독성은 화학물질의 심한 안 손상/안 자극 반응을 예측하는데

있어서, 일차적이지는 않지만, 생체 내에서 주로 각막 혼탁, 홍채염, 결막 충혈 및 결막 부종을 나타냄으로써 메카니즘적 역할을 담당한다.

2. 다양한 화학적 특성, 화학적 분류, 분자량, LogPs, 화학구조 등 광범위한 시험물질들이 본 시험법 가이드라인을 근거로 한 검증연구에서 평가되었다. The EpiOcular™ EIT 검증연구 데이터베이스는 OECD QSAR toolbox analysis에 근거하여 95개의 상이한 유기 작용기를 포괄하는 총 113개의 시험물질로 구성되어 있다⁽⁷⁾⁽⁸⁾. 이러한 시험물질의 대부분은 단일성분으로 이루어져 있지만, 다수의 성분으로 구성된 몇몇의 화합물(3개의 단일 중합체(homopolymers), 5개의 공중합체(copolymers), 및 10개의 유사중합체(quasi polymers)를 포함한다. 물리적 상태와 UN GHS 분류 측면에서 113개 물질은 13개의 Category 1 액체, 15개의 Category 1 고체, 6개의 Category 2A 액체, 10개의 Category 2A 고체, 7개의 Category 2B 액체, 7개의 Category 2B 고체, 27개의 No Category 액체, 및 28개의 No Category 고체로 나누어진다⁽⁷⁾⁽⁸⁾.

3. 본 가이드라인은 화합물 및 혼합물, 고체, 액체, 반고체 및 왁스에 적용될 수 있다. 수용성 또는 비수용성인 액체와 물에 잘 녹거나 녹지 않는 고체 물질 모두 적용 가능하다. 가능한 고체는 적용하기 전에 미세분말로 갈아서 처리하며 다른 전처리는 필요하지 않다. 기체와 에어로졸은 아직 검증연구에서 평가되지 않았다. RhCE 기술을 이용해서 기체와 에어로졸을 시험할 수 있는 가능성은 있으나 본 시험법 가이드라인을 기체와 에어로졸에 적용하는 것은 적합하지 않다.

4. 자연적으로 또는 물질처리 후, MTT 포르마잔 (formazan)과 같은 영역의 빛을 흡수하는 시험물질이나 생염료인 MTT를 MTT 포르마잔으로 직접 환원시킬 수 있는 시험물질은 조직생존을 측정을 간섭할 수 있으므로 정확한 값을 얻기 위해서는 이를 보정해줘야 한다. 이를 위해 적절한 대조군(adapted control)이 필요할 수 있으며, 이때 적절한 대조군은 시험물질로 인한 간섭의 종류와 MTT 포르마잔을 정량하는 방법에 따라 달라질 수 있다(VI-4 항 참조).

5. 사전검증⁽¹⁸⁾과 검증⁽⁷⁾⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾연구 결과를 통해 EpiOcularTM EIT은 실험 수행 경험이 없는 실험실로 전수가 가능하며, 또한 실험실내, 실험실 간 재현성이 있음이 입증되었다. 이러한 검증연구들을 근거할 때 EpiOcularTM EIT의 예측의 일치도, 즉 재현성은 대략 실험실 내 95%, 실험실 간 93%이다.

6. EpiOcularTM EIT은 UN GHS 분류체계에 따른 안 자극 또는 심한 안 손상의 분류가 필요하지 않는 물질을 식별하는데 사용될 수 있다⁽¹⁾. 검증연구에서 얻어진 결과에 의하면, UN GHS 분류 시스템⁽¹⁾에 따라 분류된 *in vivo* 토끼 안점막자극시험 데이터(OECD TG 405)⁽²⁾⁽¹²⁾와 비교했을 때 EpiOcularTM EIT은 80%의 정확도(112개 시험물질), 96%의 민감도(57개 시험물질), 4%의 위음성율(57개 시험물질), 63%의 특이도(55개 시험물질) 및 37%의 위양성율(55개 시험물질)로 나타났다⁽⁷⁾.

EpiOcularTM EIT을 사용하여 97개의 액체 농화학 물질을 평가한 결과는 이러한 종류의 혼합물에 대한 평가를 수행한 검증연구⁽¹⁹⁾의 결과와 유사하였다. 이 때 사용된 97개의 제제는 *in vivo* 토끼 안점막자극시험 데이터(OECD TG 405)⁽²⁾⁽¹²⁾에 근거한 UN GHS 분류 시스템⁽¹⁾에 따라서 다음과 같이 분류된다; 21개의 Category 1, 19개의 Category 2A, 14개의 Category 2B 및 43개의 No Category 물질로 나뉜다. 이 연구에서는 82%의 정확도(97 제제), 91%의 민감도(54개 제제), 9%의 위음성률 (54개 제제), 72%의 특이도(43개 제제) 및 28%의 위양성률 43개 제제)을 나타냈다⁽¹⁹⁾. 분류된 화학물질을 미분류 화학물질과 구분하기 위해 기준치를 본 가이드라인의 기준인(VI-6-가 참조) 60%에서 65%로 높이면 민감도를 94%로 증가되고, 특이도는 67%로 감소되어 전체적 정확도는 82%로 나타났다.

화학물 또는 혼합물에 대한 EpiOcularTM EIT의 위음성율(즉, *in vivo* UN GHS Category 2 시험물질들이 EpiOcularTM 안자극시험법에서 평균 조직생존율이 60%를 초과하여 분류 또는 표시가 요구되지 않는 물질로 예측됨 ; VI-6-가 참조)은 최대 12%로 나타났다. 보고에 의하면 토끼 안점막 자극시험에 의해서도 UN GHS Category 2로 분류된 시험물질들이 시험법 자체의 변동성 때문에 반복된 시험에서 동일하게 UN GHS No Category로 평가된다⁽²⁰⁾.

단일 또는 혼합물질에 대한 EpiOcular™ EIT의 위양성율(즉, *in vivo* UN GHS No Category 시험물질들이 EpiOcular™ EIT에서 평균 조직생존율이 60% 이하로 나타내 분류 또는 표시가 필요한 물질로 예측됨; VI-6-가 참조)은 본 시험법 가이드라인에서 그리 심각하지 않다. 왜냐하면, 60% 이하의 조직생존율을 나타내는 모든 시험물질은 규제요건에 맞게 증거 가중치(weight-of-evidence) 접근방식에 따른 순차적 시험전략을 사용하여 적절하게 검증된 다른 *in vitro* 시험법 또는 최후의 수단으로 토끼를 이용한 *in vivo* 시험법을 추가적으로 수행해야하기 때문이다.

본 시험법은 모든 종류의 화학물질에 적용될 수 있으며 음성 결과(조직생존율 > 60%)가 나오면 안 자극과 심한 안 손상을 일으키는 시험물질로 분류되지 않는 것으로 한다(UN GHS No Category). UN GHS 이외에 다른 분류 체계하에서 EpiOcular™ EIT을 적용하는 것은 해당 규제당국과 협의한다.

7. 본 시험법 가이드라인의 제한점은 UN GHS에 의해 분류되어진 안 자극(눈에 대한 가역적 영향, Category2)와 심한 안 손상(눈에 대한 비가역적 영향, Category1)을 구분하지 못하고, 안 자극제(Category2A)와 약한 안 자극제 (Category 2B)도 구분하지 못한다는 것이다⁽¹⁾. 이러한 제한점을 극복하기 위해서는, 다른 적합한 시험방법이 추가적으로 요구된다.

8. EpiOcular™ EIT은 생체 내에 관찰되는 시험물질이 눈에 미치는 영향들(즉 각막, 홍채, 결막 손상)에 상관없이 심한 안 손상/안 자극에 대한 분류가 필요한 화학물질을 정확하게 예측할 수 있음이 검증되었다⁽⁷⁾⁽⁸⁾⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾. 홍채에 미치는 영향은 UN GHS에 따른 시험물질 분류에 있어서 상대적으로 중요성이 낮다는 점을 주목해야 한다⁽²⁰⁾. 홍채의 영향에 의해 분류되는 대부분의 물질은 각막 혼탁에 의해 분류되어지기 때문에 실제로 홍채염 그 자체 영향으로만 시험물질을 생체 내 시험에서 UN GHS Category 1과 2로 분류하는 것은 매우 드물다(1.8-3.1%의 시험물질만 해당됨)⁽²⁰⁾.

9. 본 시험법 가이드라인에서의 “시험물질(test chemical)”은 시험되는 물질을 의미한다.

Ⅲ. 시험원리

1. 시험물질은 최소 두 개의 3차원 RhCE 조직 모델에 국소적으로 적용되며 시험물질을 처리한 후, 후배양이 종료한 다음 조직생존율을 측정한다. RhCE 조직은 초대배양 인체세포를 수일간 배양하여 인체각막과 유사한 층상 구조와 고도로 분화된 편평 상피를 갖도록 제작되었다. EpiOcular™ RhCE 조직 모델은 최소 3개의 살아있는 세포층과 각질화되지 않은 표면으로 구성되며, 생체 내에서 관찰되는 것과 유사한 각막 구조를 나타낸다.

2. 시험물질에 의해 체내에서 주로 발생하는 심한 안 손상/안 자극(각막혼탁, 홍채염, 결막 충혈 및 결막부종)은 시험물질의 각막 및/또는 결막을 통한 침투와 세포 손상으로 시작되는 일련의 반응의 결과이다.

세포 손상은 여러 유형의 작용으로 일어난다; 예를 들어 ① 계면활성제, 유기용매에 의한 세포막 용해, ② 계면활성제, 유기용매, 알칼리성 및 산성 물질에 의한 고분자의 응집(특히 단백질), ③ 알칼리성 물질에 의한 지질의 비누화, ④ 표백제, 과산화물 그리고 알킬화제에 의한 알킬화 또는 고분자와의 공유결합⁽¹³⁾⁽²¹⁾⁽²²⁾. 하지만 조직 손상의 원인이 되는 물리화학적 과정들과는 상관없이 세포독성은 화학물질에 대한 전반적인 심한 안 손상/안 자극 반응을 결정짓는데 일차적이지는 않지만 기전적으로 중요한 역할을 한다⁽²³⁾⁽²⁴⁾.

더욱이, 시험물질이 심한 안 손상/안 자극을 일으킬 가능성은 주로 초기 손상 정도에 의해 결정되는데⁽²⁵⁾, 초기 손상은 세포사멸 정도⁽²³⁾, 그 결과의 반응 및 최종적인 결과⁽²⁶⁾와 관련이 된다. 따라서 경미한 자극물질은 일반적으로 각막 상피의 표면에만 영향을 미치며, 약한, 중등도(mild, moderate)의 자극물질은 주로 상피와 간질(Stroma) 표면에 손상을 일으키며, 심한 자극제는 상피와 간질 깊은 부위, 때로는 각막 내피세포에도 손상을 일으킨다⁽²⁴⁾⁽²⁷⁾.

심한 안 손상이나 안 자극 분류 및 표시가 필요한 물질(UN GHS Category 1과 2)로부터 분류 및 표시가 필요치 않는 물질(UN GHS No Category)을 구별하기 위해서 시험물질을 국소적으로 노출시킨 후 EpiOcular™ RhCE 조직 모델의 생존율을 측정하는 것은 심한 안 손상 또는 안 자극을 일으키는 모든 물질이 각막 상피세포 및 결막에서 세포독성을 유도할 것이라는 가정에 근거한 것이다.

3. EpiOcular™ EIT에서 RhCE 조직생존율은 살아있는 세포에서 생염료인 MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Thiazolyl blue tetrazolium bromide; CAS No. 298-93-1]가 효소반응에 의해 청색의 MTT 포름아잔 염으로 변환되어 이를 조직으로부터 추출하여 정량적으로 측정한 것이다⁽¹⁴⁾. UN GHS에 따른 분류 및 표시가 필요하지 않은 시험물질은 조직생존율이 정해진 역치수준 이하로 떨어지지 않는 물질이라는 것을 의미한다(즉, 조직생존율 > 60%이면 UN GHS No Category로 간주된다).

IV. 숙련도 확인

1. 경제협력개발기구(OECD) 시험법 가이드라인 492를 참고하면 EpiOcular™ EIT을 사용하기 전에 실험실은 표 1에 제시된 15개의 숙련도 시험물질을 정확하게 예측함으로써 기술적 숙련도를 증명하여야 한다. 이 시험물질들은 유럽동물대체시험법검증센터(EURL ECVAM)/ 유럽 화장품 안자극 검증연구 Cosmetics Europe Eye Irritation Validation Study (EIVS)에서 사용되었던 시험물질에서 선정하였다⁽⁷⁾⁽⁸⁾. 그 선정된 화학물질은 가급적 (i) 다른 물리적 성상을 가지며; (ii) 토끼 안자극시험(OECD TG 405)⁽²⁾⁽¹³⁾에서 얻은 결과와 UN GHS 분류 체계(즉, Category 1, 2A, 2B, 또는 No Category)⁽³⁾를 근거로 하여 생체 내 안 손상/안 자극 반응의 전 영역을 포함하며; (iii) 물질 분류에 있어서의 다양한 생체 내 요인⁽¹⁴⁾을 포함하며; (iv) 검증연구에 사용되었던 시험물질군을 대표하며⁽¹²⁾; (v) 유기 작용기가 광범위하고 적절하게 포괄하여야 하며; (vi) 명확히 정의된 화학 구조를 가지고 있으며; (vii) 색깔이 있는 물질이거나/또는 직접적으로 MTT를

환원시키며; (viii) EpiOcular™ EIT 검증연구에서 재현성 있는 결과가 나오며; (ix) 검증연구에서 EpiOcular™ EIT에 의해서 정확하게 예측되며; (x) EpiOcular™ EIT 연구결과에 기반하여 생체 외 반응의 전 범위 (0~100% 생존율)를 다루며; (xi) 상업적으로 구매 가능하며; (xii) 취득이나 처분이 어렵지 않는 물질들을 포함한다. 제시된 시험물질을 구할 수 없거나 다른 정당한 이유로 사용할 수 없는 경우 위에 명시된 기준을 충족하는 다른 시험물질(예시, VRM 검증에서 사용한 시험물질)을 사용할 수 있다. 하지만 그러한 예외는 타당한 근거를 제시해야 한다.

표 1: 숙련도 확인용 시험물질 (Proficiency chemicals)

Chemical Name	CASRN	Organic Functional Group ¹	Physical State	VRM viability (%) ²	VRM Prediction	MTT Reducer	Colour interf.
<i>In Vivo</i> Category 1 ³							
Methylthioglycolate	2365-48-2	Carboxylic acid ester; Thioalcohol	L	10.9±6.4	Cat 2 / Cat 1	Y (strong)	N
Tetraethylene glycol diacrylate	17831-71-9	Acrylate Ether	L	34.9±15.3	Cat 2 / Cat 1	N	N
2,5-Dimethyl-2,5-hexanediol	110-03-2	Alcohol	S	2.3±0.2	Cat 2 / Cat 1	N	N
Sodium oxalate	62-76-0	Oxocarboxylic acid	S	29.0±1.2	Cat 2 / Cat 1	N	N
<i>In Vivo</i> Category 2A ³							
2,4,11,13-Tetraazatetradecane-diimidamide, N,N'-bis(4-chlorophenyl)-3,12-diimino-, di-D-gluconate (20%, aqueous) ⁴	18472-51-0	Aromatic heterocyclic halide Aryl halide Dihydroxyl group Guanidine	L	4.0±1.1	Cat 2 / Cat 1	N	Y (weak)
1,5-Naphthalenediol	83-56-7	Fused carbocyclic aromatic Naphthalene Phenol	S	21.0±7.4	Cat 2 / Cat 1	Y (medium)	N
<i>In Vivo</i> Category 2B ³							
Diethyl toluamide	134-62-3	Benzamide	L	15.6±6.3	Cat 2 / Cat 1	N	N
2,2-Dimethyl-3-methylenebicyclo [2.2.1] heptane	79-92-5	Alkane, branched with tertiary carbon Alkene Bicycloheptane Bridged-ring carbocycles Cycloalkane	S	4.7±1.5	Cat 2 / Cat 1	N	N
<i>In Vivo</i> No Category ³							
1-Ethyl-3-methylimidazolium ethylsulphate	342573-75-5	Alkoxy Ammonium salt Aryl; Imidazole; Sulphate	L	79.9±6.4	No Cat	N	N
Dipropyl disulphide	629-19-6	Disulfide	L	81.7±6.4	No Cat	N	N
Piperonyl butoxide	51-03-6	Alkoxy Benzodioxole; Benzyl; Ether	L	104.2±4.2	No Cat	N	N
Polyethylene glycol (PEG-40)	61788-85-0	Acylal; Alcohol; Allyl;	Viscous	77.6±5.4	No Cat	N	N

hydrogenated castor oil		Ether					
1-(4-Chlorophenyl)-3-(3,4-dichlorophenyl) urea	101-20-2	Aromatic heterocyclic halide Aryl halide Urea derivatives	S	106.7±5.3	No Cat	N	N
2,2'-Methylene-bis-(6-(2H-benzotriazol-2-yl)-4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenol)	103597-45-1	Alkane branched with quaternary carbon Fused carbocyclic aromatic Fused saturated heterocycles; Precursors quinoid compounds; tert-Butyl	S	102.7±13.4	No Cat	N	N
Potassium tetrafluoroborate	14075-53-7	Inorganic Salt	S	88.6±±3.3	No Cat	N	N

CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number;

UN GHS = United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals⁽¹⁾ ;

VRM = Validated Reference Method, i.e., EpiOcular™ EIT ;

Colour interf. = colour interference with the standard absorbance (Optical Density(OD)) measurement of MTT formazan.

1. OECD Toolbox 3.1 분석에 따른 유기작용 그룹⁽⁸⁾
2. 유럽 동물대체시험법검증센터/ 화장품 유럽 안자극 검증연구 결과에 근거함⁽⁷⁾⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾.
3. *In vivo* 토끼 안자극시험법 (OECD TG 405)⁽²⁾⁽¹²⁾ 및 UN GHS⁽¹⁾의 결과에 근거함.
4. 분류 2A 또는 2B의 경우 두 그룹을 구분하는 UN GHS의 분류 기준의 해석에 따라 달라진다. 즉 시험 7일차에 3마리 동물 중 1마리 혹은 3마리 중 2마리가 독성영향을 나타내면 카테고리 2A 분류됨. 모든 *in vivo* 시험은 3마리의 동물을 포함. 한 마리의 동물에서 각막의 혼탁을 제외하고 모든 평가항목들이 7일 이내에 "0"점으로 회복되었음. 또한 한 마리의 동물은 7일까지 완전히 회복되지 않았고 7일차에 각막 혼탁점수가 1점이었고 9일째에 완전히 회복되었음.

2. 숙련도 시험의 일부로서, 사용자는 조직 수령 후 RhCE 조직 모델 생산자로부터 명시된 조직의 장벽 기능(barrier properties)을 확인하는 것을 권고한다(VI-1, VI-2-나, 마 참조). 이 절차는 특히 조직이 장거리/장시간에 걸쳐 운송되었을 때 중요하다. 시험법이 성공적으로 확립되고 시험법 사용에 대한 숙련도를 습득하고 이를 증명할 수 있으면, 조직의 장벽 기능 확인은 일상적으로 매번 실시될 필요는 없다. 하지만 시험법을 일상적으로 사용할 때에는 정기적으로 조직의 장벽 기능을 점검 할 것을 권장한다.

V. 시험방법

이 가이드라인에서 다루고 있는 시험법은 OECD가 인정하는 과학적으로 검증된 EpiOcular™ EIT으로서, 검증된 참고방법(Validated Reference Method, VRM)으로 지칭된다⁽⁷⁾⁽¹¹⁾. 실험실에서 EpiOcular™ EIT을 수행하고자 할 때 제공되고 있는 표준작업지침서를 참고하여 적용해야 한다⁽²⁸⁾.

VI. RhCE 시험법 구성요소

1. 일반적인 조건(General conditions)

인체에서 유래된 적절한 세포는 3차원 각막 유사 상피조직 제작을 위해 사용되어야 하며, 이 조직은 각질화되지 않으며 점진적으로 층화된 세포로 구성되어야 한다. RhCE 조직 모델은 영양분이 세포로 전달될 수 있는 기공의 합성막을 갖는 인서트에 제작된다. 제작된 각막 유사 상피모델은 살아있고, 각질화는 되지 않은 상피세포들의 다층 구조로 존재해야 한다. RhCE 조직 모델은 *in vivo*에서 각막 상피가 노출되는 방식과 같이 시험물질이 직접 국소 노출이 가능하도록 공기와 직접적으로 닿을 수 있는 상피 표면을 가져야 한다. RhCE 조직 모델은 Triton X-100과 같은

세포독성 기준 물질이 빠르게 투과되지 않도록 충분히 견고한 기능적인 장벽을 형성해야 한다. 이 장벽의 기능은 입증되어야 하는데, 이 기능은 고정된 농도의 기준 물질(예시, 100 μ L의 0.3% (v/v) Triton X-100)을 적용시켰을 때 조직생존율이 50% 미만으로 감소하는데 필요한 노출시간(ET₅₀)으로 평가할 수 있다(VI-2-마 참조). 가장자리 주변에서의 물질 투과되는 모델은 각막 노출의 모델로 적합하지 않을 수 있기 때문에, RhCE 조직 모델은 살아있는 조직의 가장자리 주변에 시험물질이 투과되지 않도록 해야 한다. RhCE 조직 모델은 세균, 바이러스, 마이코플라스마, 진균 등에 오염되지 않아야 한다.

2. 기능적인 조건(Functional conditions)

가. 생존율(Viability)

조직생존율을 정량화하기 위해 MTT 시험법을 이용한다⁽¹⁴⁾. RhCE 조직 모델의 살아있는 세포들은 생염료 MTT를 파란색을 띠는 MTT 포르마잔 침전물로 환원시키며, 이 침전물은 조직으로부터 이소프로판올(또는 유사한 용매)을 이용하여 추출된다. 추출된 MTT 포르마잔은 표준 흡광도(Optical Density, OD) 측정법이나 HPLC/UPLC-분광광도계를 이용하여 정량할 수 있다⁽²⁹⁾. 추출하는 용매의 흡광도는 충분히 작아야 한다(즉, 0.1 미만). RhCE 조직 모델 사용자는 사용된 각 배치의 RhCE 조직모델이 정해진 기준에 부합한 음성대조군 값을 갖는지를 확인해야한다. RhCE 조직모델 개발자/공급자는 음성대조군의 흡광도 값(시험법 조건에서) 허용범위를 (상한 및 하한) 설정해야 한다. VRM에 있어서 음성대조군 흡광도 값의 허용 가능 범위는 표 2에서 제시된 바와 같다⁽³⁰⁾. HPLC/UPLC를 이용하여 흡광도를 측정하는 실험자는 음성대조군의 허용 기준으로 표 2에 제시된 흡광도 범위를 참고해야 한다. 음성대조물질로 처리된 조직이 시험의 노출기간 동안 안정적으로 배양되었다는 것(유사한 조직생존율 제공)을 기록해 두어야 한다.

표 2 : 음성대조군 OD 값의 허용범위

실험 방법 (Test Method)	최소 허용치 (Lower acceptance limit)	최대 허용치 (Upper acceptance limit)
EpiOcular™ EIT(OCL-200)-VRM (액체 및 고체 프로토콜 해당)	> 0.8 ¹	< 2.5

¹본 허용 한도는 운송 및 저장 시간이 장기화 될 경우 (예, >4일)를 고려한 것으로, 이 경우 시험법의 결과에 영향을 주지 않는 것으로 나타났다⁽³⁰⁾.

나. 장벽 기능(Barrier function)

RhCE 조직 모델은 Triton X-100과 같은 세포독성 기준 물질의 빠른 투과 (ET₅₀(표 3)으로 추정될 수 있음)를 저지할 수 있도록 충분히 두껍고 튼튼해야 한다. 사용된 각 배치의 RhCE 조직모델의 장벽 기능은 RhCE 조직 모델 개발자/판매자가 최종 사용자에게 조직 공급 시에 입증되어야 한다(VI-2-마 참조).

다. 조직형상(Morphology)

RhCE 조직 모델의 조직학적 검사를 통해 인체 각막과 유사한 상피구조(최소 3개의 층으로 구성된 살아있는 상피세포와 각질화 되지 않는 표면)임을 입증해야 한다. 하지만 이러한 조직학적 검사는 사용된 각 배치의 조직마다 요구되진 않는다. VRM에서 모델의 적합한 조직형태가 확립되었기 때문에 시험법 사용자는 사용된 각 배치의 조직마다 적합한 조직형태를 다시 입증할 필요는 없다.

라. 재현성(Reproducibility)

재현성은 양성대조군과 음성대조군 결과는 시간에 따른 재현성을 보여야 한다.

마. 품질 관리(Quality Control, QC)

개발자/공급자가 사용된 각 배치의 RhCE 조직모델이 정해진 생산 출하 기준에 적합하다는 것을 증명했을 때만 RhCE 조직모델을 사용할 수 있다. 생존율(VI-2-가 참조)과 장벽 기능(VI-2-나 참조)은 가장 적합한 생산출하의 기준이다. RhCE 조직 모델의 개발

자/공급자는 ET₅₀값(VI-1, VI-2-나 참조) 측정을 통해 장벽기능의 허용범위(상한 및 하한)를 설정하여야 한다. EpiOcular™ OCL-200조직모델 개발/공급자에 의해 각 배치의 출하 품질관리 기준으로서 사용되었던 ET₅₀값 허용 기준(VRM에서 사용됨)은 표 3에서 제시하는 바와 같다. RhCE 조직 개발/공급자는 모든 생산출하 기준을 준수하였다는 것을 입증하는 자료를 시험법 사용자에게 공급하여 사용자들이 이러한 정보를 시험 보고서에 포함할 수 있도록 해야 한다. UN GHS에 따른 안 자극 또는 심한 안 손상에 대한 분류 및 표시를 요구하지 않는 물질들의 신뢰성있는 예측을 위해 이러한 모든 생산출하 기준을 충족하는 조직을 이용하여 얻은 결과만이 평가에 허용될 수 있도록 한다.

표 3 : 품질관리(QC) 출하 기준

시험법 (Test Method)	허용하한 (Lower acceptance limit)	허용상한 (Upper acceptance limit)
EpiOcular™ 안자극시험법 (OCL-200)-VRM (0.3% (v/v) Triton X-100 100 μL)	ET ₅₀ = 12.2 분	ET ₅₀ = 37.5 분

3. 시험물질과 대조물질의 적용

가. 매회 실험에서 각각의 시험물질과 대조물질에 대하여 물질 당 최소 2개의 조직 시료를 사용해야 한다. 시험물질 또는 대조물질을 처리하기 전에 축축한 사람 눈의 상태처럼 만들기 위해서 VRM의 조직 표면에 칼슘과 마그네슘을 함유하지 않은 Dulbecco's 인산염 완충액(Ca²⁺/Mg²⁺ 함유되지 않는 DPBS) 20 μL를 전처리하고 차광상태로 37±1 °C, 5±1% 이산화탄소(표준 배양 조건)를 포함한 습윤한 조건의 배양기에서 30±2 분 동안 배양한다. 배양 후, 시험물질과 대조물질을 조직에 노출시킴으로써 조직에 대한 처리가 시작된다. 시험물질의 액체, 고체 성상에 따라 두 가지의 다른 처리 프로토콜이 사용된다. 어떤 경우이든지, 무제한 용량(infinite dose)으로 처리하는 것은 피하되, 충분한 양의 시험물질이나 대조군이 상피 표면을 균등하게 덮을 수 있도록 처리해야 한다(VI-3-나, 다 참조). 시험 절차에 따르면, 조직생존을

측정은 시험물질에 노출 후 즉시 측정하는 것이 아니라 시험물질을 조직으로부터 씻어낸 후 새 배지에서 충분히 긴 시간동안 후배양을 거친 후 측정해야 한다. 후배양 기간은 약한 세포 독성에서 조직이 회복할 수 있게 하고, 또한 확실한 세포독성이 나타나도록 해준다.

나. 37 °C 이하에서 피펫팅 할 수 있는(필요시 양변위 피펫을 이용해서) 시험물질은 VRM에서 액체로 취급한다. 점성 있는 물질, 밀랍, 수지성 물질, 젤 같은 불분명한 물리적 상태를 갖는 시험물질은 어떤 처리 프로토콜을 사용할지 결정하기 전에 37±1 °C에 15±1 분 동안 배양해야 한다. 만일 그 시험물질이 배양기간 후(필요시 양변위 피펫을 이용해서) 피펫팅이 가능해지면 그 시험물질을 액체로 취급해야 하고 항온 수조(37±1 °C)에서 바로 조직으로 적용해야 한다. 피펫팅이 가능하지 않으면 고체로 취급해야 한다(VI-3-다 참조). VRM에 따라 50 µL의 액체 시험물질을 0.6 cm²의 조직 표면에 균등하게 도포한다(83.3 µL/cm² 적용). 액체 시험물질과 이와 동시에 대조군 물질이 처리된 조직들은 표준 배양 조건에서 30±2 분 동안 배양한다. 시험물질 처리가 끝나면 시험물질과 대조군 물질을 상온에서 Ca²⁺/Mg²⁺이 함유되지 않은 DPBS로 충분히 세척하여 조직표면으로부터 조심스럽게 제거해야 한다. 세척종료 후 상온에서 12±2 분 동안 새 배지에 침지하여 조직에 흡수된 시험물질을 충분히 제거하고 다시 새로운 배지로 교체한 다음, 표준 배양조건 하에서 120±15 분간 배양한 다음 MTT assay를 실시한다⁽²⁸⁾.

다. 최대 37 °C 에서 피펫팅 할 수 없는 시험물질은 VRM에 따라 고체로 취급한다. VRM에 따라 대략 50 mg의 고체 시험 물질을 0.6 cm²인 조직 표면에 교정된 도구(예시, 50 mg의 sodium chloride를 담기 위한 교정된 평평한 스푼)를 이용해서 균등하게 적용한다(대략 83.3 mg/cm² 적용). 적용한 시험물질의 양은 조직 전체 표면을 덮는데 충분해야 한다. 가능하면 고체는 미세분말 상태로 실험이 진행되어야 한다. 고체 시험물질과 이와 동시에 대조군 물질이 처리된 조직은 표준 배양 조건 하에서 6±0.25 시간 동안 배양한다. 시험물질 처리가 끝나면 시험물질과 대조군 물질을 상온에서 Ca²⁺/Mg²⁺ 함유되지 않는 DPBS로 충분히 세척하여 조직 표면으로부터

조심스럽게 제거되어야 한다. 세척종료 후 상온에서 25 ± 2 분 동안 새 배지에 침지하여 조직에 흡수된 시험물질을 충분히 제거하고 다시 새로운 배지로 교체한 다음, 표준 배양조건 하에서 120 ± 15 분간 배양한 다음 MTT assay를 실시한다⁽²⁸⁾.

라. 조직생존율(음성대조군 기준)과 민감도(양성대조군 기준)가 기존 실험의 결과를 바탕으로 정해진 허용 범위 내에 있다는 것을 입증하기 위해서 매회 실험마다 음성대조군과 양성대조군을 포함시켜야 한다. 또한 음성대조군은 시험물질로 처리된 조직의 상대적 % 생존율($Viability_{test}$)을 계산하기 위한 기준치(100% 조직생존율)로 사용된다. VRM에서 양성대조군 물질은 메칠아세테이트 원액(neat methyl acetate, CAS No. 79-20-9; Sigma-Aldrich, Cat# 186325; liquid)이며, 음성대조군 물질은 초순수(Ultrapure H_2O)를 권장한다. 이러한 물질은 VRM의 사전-검증 및 검증연구에 사용된 대조군 물질이고 대부분의 과거 실험데이터에 존재하는 물질들이다. 다른 양성 또는 음성대조군 물질을 사용하기 위해서는 과학적으로 적절한 정당성을 입증해야 한다.

액체와 고체 시험물질에 대한 각각의 음성과 양성대조군들이 필요하다. 액체 시험물질과 동시에 수행되는 대조군의 경우, 액체 시험물질이 처리했던 것처럼 $50\ \mu L$ 의 음성대조군과 양성대조군 물질을 조직에 정확히 적용한 다음, 30 ± 2 분간 표준 배양조건 하에서 노출시키고 세척종료 후 상온에서 12 ± 2 분 동안 새 배지에 침지하여 조직에 흡수된 시험물질을 충분히 제거하고 다시 새로운 배지로 교체한 다음, 표준 배양조건 하에서 120 ± 15 분간 배양한 다음 MTT assay를 실시한다. 고체 시험물질과 동시에 수행되는 대조군의 경우, MTT assay 진행하기 전에, $50\ \mu L$ 의 음성대조군과 양성대조군 물질을 조직에 적용한 다음(액체 시험물질의 시험에서 설명한 것처럼) 6 ± 0.25 시간 동안 표준 배양조건에서 노출시키고 세척 종료 후 새로운 배지로 25 ± 2 분 동안 상온에 방치하여 조직에 흡수된 시험물질을 충분히 제거하고 다시 새로운 배지로 교체한 후, 표준 배양조건 하에서 18 ± 0.25 분간 배양한 다음 MTT assay를 실시한다⁽²⁸⁾. 동일 회차의 실험에 포함된 동일한 물리적 상태(액체 또는 고체)를 갖는 모든 시험물질에 대해서는 음성대조군과 양성대조군 한 세트가 충분하다.

4. 조직생존율 측정

가. 본 시험법 가이드라인에서 조직생존율을 측정하기 위해 사용되는 MTT assay는 표준화된 정량분석법이다⁽¹⁴⁾. MTT 시험법은 3차원 조직 모델에서도 사용가능한 방법이다. MTT 시험법은 노출 후 배양이 끝난 후 즉시 수행한다. VRM에 따르면 1 mg/mL의 MTT 용액 0.3 mL를 RhCE 조직모델에 분주하고 표준 배양 조건에서 180±10 분 동안 배양한다. 생염료인 MTT는 RhCE 조직모델의 살아있는 세포에 의해 청색을 띠는 MTT 포르마잔 침전물로 환원된다. 침전된 청색 MTT 포르마잔 생성물은 2 mL의 이소프로판올(또는 유사한 용매)를 이용하여 조직으로부터 추출한다. 액체 시험물질로 처리된 조직은 처리된 조직의 위와 아래에서 그 생성된 염을 추출해야 하지만, 고체 물질과 색상이 있는 액체 시험물질로 처리된 조직은, 오직 처리된 조직의 아랫부분에서만 추출해야 한다(조직에 잔여할 수 있는 시험물질로 인한 이소프로판올 추출 용액의 오염 가능성을 최소화하기 위해서). 쉽게 세척되지 않는 액체 시험물질로 처리된 조직은 조직의 아랫부분에서만 추출해도 된다. 동시에 수행된 음성대조군과 양성대조군은 시험물질과 유사하게 처리되어야 한다. 추출된 MTT 포르마잔의 함량은 570 nm (570±30 nm 필터) 파장에서의 표준흡광도(OD) 측정이나 또는 HPCL/UPLC 측정을 통해 정량한다(VI-4-아 참조)⁽²⁹⁾.

나. 시험물질의 광학성질 또는 MTT 시약과의 화학적 반응은 MTT 포르마잔의 측정에 방해가 되어 조직생존율 측정에 오류가 생길 수 있다. 사용되는 MTT를 청색의 MTT 포르마잔으로 직접적으로 환원시키는 시험물질이나, 자연적으로 또는 처리과정에 의해 MTT 포르마잔과 같은 OD 범위(약 570 nm)에서 빛을 흡수함으로써 색 간섭을 일으키는 시험물질들은 MTT 포르마잔의 측정을 방해 할 수 있다. MTT를 직접적으로 환원시키거나 색 간섭을 일으킬 가능성 있는 시험물질은 실험 전에 반드시 사전점검이 수행되어야 하고, 이러한 시험물질의 잠재적 간섭을 감지하고 교정하기 위해 추가적인 대조군을 사용해야 한다(VI-4-다~사 참조). 특히, 이것은 특정 시험물질이 RhCE 조직모델로부터 완전히 씻겨나가지 않았거나 그 시험물질이 각막 유사상피를 투과하여 MTT 분석 시에 RhCE 조직모델에 남아있을 경우 더욱 중요하다. MTT 포르마잔과

동일한 파장의 빛을 흡수(자연적 또는 처리 후에)하는 시험물질은 강한 간섭 (570 ± 30 nm에서 강한 흡수) 때문에 MTT 포르마잔 측정을 위해 표준 흡광(OD) 측정법을 적용할 수 없으므로 HPLC/UPCL-분광광도법을 사용하여 MTT 포르마잔을 측정해야한다(VI-4-사, 아 참조)⁽²⁹⁾. 직접적인 MTT 환원과 착색제에 의한 간섭을 감지하고 교정하는 방법에 대한 자세한 설명은 VRM 표준작업지침서⁽²⁸⁾에 수록되어 있다. 직접적인 MTT-환원제와 색 간섭 물질을 확인하고 다루는 법에 대한 지침을 제공하는 구체적인 순서도는 부록 2에서 제시된 바와 같다.

다. MTT 포르마잔과 동일한 파장의 빛을 흡수하는 시험물질(자연적으로 또는 처리 후)에 의한 잠재적 간섭여부를 확인하고 추가적인 대조군이 필요한지 결정하기 위해 시험물질을 물(노출 환경) 및/또는 이소프로판올(추출 용매)에 녹인 후 이 용액에 대한 스펙트럼 분석을 수행한다. VRM에 따라 50 μ L 또는 50 mg의 시험물질을 (i) 1 mL의 물에 첨가하고 표준 배양 조건에서 약 1 시간 정도 방치하거나 (ii) 2 mL의 이소프로판올에 첨가하여 실온에서 2-3 시간 동안 방치한다⁽²⁸⁾. 만약 시험물질을 물 및/또는 이소프로판올에 첨가한 용액이 570 \pm 30 nm 범위에서 충분한 빛을 흡수한다면(VRM 경우에는 이소프로판올 또는 물의 흡광도 값을 뺀 후 시험용액의 OD가 음성대조군의 평균 OD 값의 약 5%와 일치하는 수치인 0.08을 초과), 시험물질이 MTT 포르마잔의 표준 흡광도 측정을 간섭한다고 추정할 수 있으며, 추가적으로 색상을 띠는 대조군에 대한 시험을 수행하거나 또는 이러한 대조군이 필요하지 않는 HPLC/UPLC-분광광도계 측정법을 이용하여 얻어진 값을 보정해야 한다(VI-4-사, 아 및 부록 2 참조). 표준 흡광도(OD)를 측정할 때 간섭을 일으키는 시험물질은 전체 시험절차에 맞게 적어도 2회 반복실험을 해야 한다. 살아있는 조직으로부터 비특이적으로 남아 있는 색에 대한 대조군(Non-specific color, NSC_{living})을 만들기 위해 MTT 배양 단계에서 조직에 MTT 용액 대신 배지에 넣고 배양한다⁽²⁸⁾. NSC_{living} 대조군은 색상이 있는 시험물질과 동시에 실험이 수행되어야하며, 여러번 시험을 하는 경우 살아있는 조직들이 갖는 고유한 생물학적 변이성 때문에 매 시험 실시마다 독립적인 NSC_{living} 대조군이 필요하다. 순수 조직생존율(true tissue viability)은 간섭을 일으키는 시험물질을 노출시킨 조직을 MTT 용액으로 배양하여 얻은 조직생존율(% Viability_{test})에서, 그 시험을 보정

하기 위해 간섭을 일으키는 물질을 조직에 노출시킨 후 MTT 용액 대신 배지로 배양하여 얻어진 비특이적 색상(% NSC_{living})을 빼서 계산한다.

즉, 순수 조직생존율 = [% Viability_{test}] - [% NSC_{living}].

라. 시험물질이 직접적인 MTT 환원물질인지 구별하기 위해서 새롭게 조제한 MTT 용액을 각각의 시험물질에 첨가해야 한다. VRM에서는 50 μ L 또는 50 mg의 시험물질을 1 mg/mL 농도의 MTT 용액 1 mL에 첨가하여 이 혼합물을 표준 배양조건에서 약 3 시간 동안 배양한다⁽²⁸⁾. MTT 용액의 용매인 멸균된 탈이온수 50 μ L을 음성대조군으로 사용한다. 만약 시험물질을 함유한 MTT 혼합용액(또는 불용성 시험물질의 경우 현탁액)이 청색 또는 자색으로 변한다면, 시험물질은 직접적으로 MTT를 환원시킨다고 추정되어지며, 표준 흡광도(OD) 측정법 또는 HPLC/UPLC-분광광도계 측정법(부록 2 참조) 사용하여 사멸된 RhCE 조직모델에서 추가적 점검(functional check)이 수행되어야 한다. 이 추가적인 점검은 극히 낮은 대사 활성만 가지고 있고 살아있는 조직과 비슷한 방식으로 시험물질을 흡수·보유하는 사멸된 조직을 사용한다. VRM에 따르면 이러한 사멸된 조직은 살아있는 조직을 낮은 온도에 노출시켜 만든다("freeze-killed"). MTT를 환원시키는 시험물질은 비특이적 MTT 환원(Non-Specific MTT Reduction: NSMTT) 대조군을 만들기 위해 사멸된 조직에서 전체 시험절차에서 시행되는 것과 같이 최소 2회 반복실험을 실시한다⁽²⁸⁾. 실시하는 각각의 시험실시 횟수와는 상관없이 시험물질 당 하나의 NSMTT 대조군이면 충분하다. 순수 조직생존율(True tissue viability)은 다음과 같이 계산된다; MTT를 환원시키는 시험물질에 노출된 살아있는 조직으로부터 얻은 조직생존율(% Viability_{test})에서 사멸된 조직에 동일한 MTT 환원물질에 노출시킨 후 얻어진 비특이적 MTT 환원율(% NSMTT)을 뺀다. % NSMTT는 시험결과를 보정하기 위해 동시에 진행되는 음성대조군 시험결과로 나누어 계산한다.

즉, 순수 조직생존율 = [% Viability_{test}] - [% NSMTT]

마. 색 간섭(VI-4-라 참조)과 직접적인 MTT 환원을(VI-4-라 참조) 모두 일으키는 시험물질들은 표준 흡광도(OD)를 측정할 때 위에서 서술된 NSMTT와 NSC_{living} 대조군 외에도 세 번째 대조군 세트가 필요하다. 이는 일반적으로 570±30 nm 범위(예, 청색, 자색, 흑색)에서 빛을 흡수하는 어두운 색의 시험물질들에 해당된다. 왜냐하면 V-1-1.4항 4)에서 설명했듯이 이들의 고유한 색은 MTT를 직접적으로 환원시킬 수 있는 능력에 대한 평가를 저해하기 때문이다. 따라서 NSC_{living} 대조군과 함께 기본적으로 NSMTT 대조군을 사용해야 한다. NSMTT와 NSC_{living} 대조군 실험을 해야 하는 시험물질은 살아있는 조직과 사멸된 조직 모두에서 시험물질을 흡수할 수 있고 잔존할 수 있다. 그러므로 이 경우에는 NSMTT 대조군은 시험물질에 의한 직접적인 MTT 환원의 가능성을 보정할 뿐만 아니라 사멸된 조직에 시험물질이 흡수되고 남아있음으로써 발생할 수 있는 색 간섭도 보정할 수 있다. 이는 색 간섭에 대한 이중보정으로 이어질 수 있는데 NSC_{living} 대조군이 이미 시험물질이 살아있는 조직에 흡수되고 남아있음으로 인해 발생하는 색 간섭을 보정하기 때문이다. 색 간섭에 대한 이중보정을 피하기 위해, 사멸된 조직의 비-특이적인 색(NSC_{killed})에 대한 세 번째 대조군이 필요하다(부록 2 참조). 이 추가 대조군 실험은 사멸된 조직에서 전체 시험절차와 같이 최소 2회 반복실험을 하며 MTT 배양 단계에서 MTT 용액 대신 배지에서 배양한다. 각 시험 횟수와 상관없이 시험물질 당 NSC_{killed} 하나의 대조군이면 충분하지만, NSMTT 대조군과 동시에 같은 회분에 실시되어야 한다. 순수 조직생존율은 다음과 같이 계산된다; 살아있는 조직에 시험물질을 노출시킨 얻어진 조직생존율(% Viability_{test})에서 % NSMTT와 % NSC_{living} 값을 빼주고, 사멸된 조직에 간섭을 일으키는 시험 화학물질을 노출시킨 다음 MTT 대신 배지를 넣어 배양하여 얻은 비특이적 색 백분율(% NSC_{killed}) 값을 더하여 계산한다(% NSC_{killed}는 보정되는 시험과 동시에 실시되는 음성대조군에 대한 상대적인 비율로 계산된다).

$$\text{즉, 순수 조직생존율} = [\% \text{ Viability}_{\text{test}}] - [\% \text{ NSMTT}] - [\% \text{ NSC}_{\text{living}}] + [\% \text{ NSC}_{\text{killed}}].$$

바. 비특이적 MTT 환원과 비특이적 색 간섭은(표준 흡광도 측정을 수행하는 경우) 조직 추출물의 OD 값을 증가시켜 분광광도의 직선 범위를 넘게 하며, 또한

비특이적 MTT 환원은(HPLC/UPLC-분광광도계 측정 실시의 경우) 조직 추출물의 MTT 포르마잔 피크면적을 증가시켜 분광광도의 직선 범위를 넓게 하므로 주의해야 한다. 따라서 규제 목적으로 시험물질에 대한 시험을 수행하기 전에 각 실험실이 상업적으로 구입 가능한 MTT 포르마잔(CAS # 57360-69-7)을 가지고 분광광도계의 OD/피크면적에 대한 직선 범위를 미리 결정해야 한다.

사. 분광광도계를 이용한 표준 흡광도(OD) 측정은 MTT 포르마잔 측정에서 관찰된 간섭이 너무 강하지 않을 때(즉, 직접적인 MTT 환원 및/또는 색 간섭에 대한 아무런 보정 없이도, 시험물질을 처리하여 얻은 조직의 MTT 추출물의 OD 값이 분광광도의 직선 범위 안에 들어오게 될 때), 직접적인 MTT 환원제와 색 간섭을 일으키는 시험물질을 측정하는 데에 적절하다. 그럼에도 불구하고, 음성대조군과 비교하여 % NSMTT 및/또는 % NSC_{living}가 60% 이상의 결과를 나타내는 시험물질들은 주의 깊게 검토되어야 한다. 왜냐하면 이 수치는 EPiOcular™ EIT에 있어서, 분류가 필요치 않는 물질들과 분류가 필요한 물질들을 구별하는 기준치이기 때문이다(VI-6-가 참조). 하지만 MTT 포르마잔 측정 시 간섭이 너무 강하면(즉, 시험 조직추출물의 보정되지 않은 OD값이 분광광도의 직선 범위 밖으로 벗어나도록 이끈다) 표준흡광도(OD) 값을 측정할 수 없다. 색상이 있는 시험물질 또는 물이나 이소프로판올과 접촉 시 발색되는 시험물질은 MTT 포르마잔의 표준흡광도(OD) 측정을 강하게 간섭하므로 HPLC/UPLC-분광광도계를 사용해서 평가할 수 있다(부록2 참조). 이는 HPLC/UPLC 시스템이 MTT 포르마잔을 발색하는 시험물질로부터 분리하는 것이 가능하기 때문이다⁽²⁹⁾. 이러한 이유로 HPLC/UPLC-분광광도계를 이용하여 독립적으로 그 시험물질이 분석된다면 NSC_{living} 또는 NSC_{killed} 대조군은 필요하지 않다.

그럼에도 불구하고 시험물질이 MTT를 직접적으로 환원시킬 가능성이 있다면 VI-4-라에 기술된 절차를 따라서 NSMTT 대조군을 사용해야 한다. 또한 VI-4-라에 기술된 바와 같이 직접적으로 MTT를 환원시키는 능력에 대한 평가를 방해하는 색상(고유의 또는 물을 사용 시 나타내는)을 갖는 시험물질에도 NSMTT 대조군이 사용되어야

한다. MTT 포르마잔을 측정하기 위해 HPLC/UPLC-분광광도계를 사용할 때, 조직생존율은 음성대조군의 MTT 포르마잔 피크면적에 대한 시험물질에 노출된 생존 조직에서 얻어진 MTT 포르마잔 피크면적의 상대적인 비율(%)로 계산한다. 직접 MTT를 환원시킬 수 있는 시험물질의 순수 조직생존율(true tissue viability)은 VI-4-라에 기술된 바와 같이 %Viability_{test}에서 %NSMTT를 뺀 값이다. 마지막으로, MTT 환원을 일으키는 물질이나 색 간섭 및 MTT를 강하게 환원시키는 물질은 조직 추출물의 흡광도(OD) 값(표준흡광도 측정법 사용시) 또는 피크면적(HPLC/UPLC-분광광도계 사용시)이 직선 범위 밖으로 벗어나게 하기 때문에 EpiOcular™ EIT으로 평가할 수 없다. 그러나 이 경우는 매우 드문 상황에서만 발생한다.

아. HPLC/UPLC-분광광도계은 모든 종류의 시험물질(유색, 무색, MTT 환원제, MTT 비환원제)에 대한 MTT 포르마잔 측정에 사용할 수 있다⁽²⁹⁾. HPLC/UPLC-분광광도계 시스템이 다양하기 때문에 각 사용자가 정확히 동일한 시스템 조건을 확립하는 것은 불가능하다. 조직 추출물로부터 MTT 포르마잔 정량에 HPLC/UPLC-분광광도계를 사용하기 전에 그 HPLC/UPLC-분광광도계 시스템이 바이오분석방법 검증 위한 지침서에 제시된 표준규격 파라미터들의 허용기준에 부합하고 있음을 입증해야 한다⁽²⁹⁾⁽³¹⁾. 주요 파라미터와 허용 기준은 부록 3에 제시되어 있다. 부록 3에 제시된 허용기준을 만족시킨다면, HPLC/UPLC-분광광도계 시스템은 측정하기에 적합하다고 간주하며, 본 시험지침서에 기술된 실험 조건으로 MTT 포르마잔을 측정할 수 있다.

5. 허용기준

품질보증 요건을 만족하는 EpiOcular™ 조직을 사용하는 매회 실험(VI-2-마 참조)에 있어서, 음성대조물질로 처리된 조직들은 운송, 입고 및 모든 프로토콜 절차 과정에서의 조직의 품질을 반영한 흡광도 값(OD)을 제시하여야 하며, 음성대조군의 흡광도 값은 표 2에 제시된 기존 시험결과로부터 확립된 기준에서 벗어나지 않아야 한다(VI-2-가 참조). 마찬가지로 양성대조군(즉,

메칠아세테이트)으로 처리된 조직들은 액체 또는 고체의 프로토콜에 따라 평균 조직생존율이 50%(음성대조군 대비) 미만으로 나타나야하는데, 이것으로 인해서 시험조건 하에서 사용되는 자극성 시험물질에 대한 사용된 조직이 제대로 반응하는 지를 확인할 수 있다⁽²⁸⁾. 시험물질과 대조물질에 대한 반복실험에 있어서 조직들 간의 차이는 허용범위 안에 있어야 한다(즉, 2개의 조직 시료들로 부터 얻은 생존율 차이는 20% 보다 작아야 하며, 3개의 조직 시료들로부터 얻은 생존율의 표준편차는 18%를 초과해서는 안 된다). 만일 음성대조군 또는 양성대조군이 허용 범위를 벗어난 결과를 보이는 시험인 경우, 그 회 시행한 시험은 ‘부적합’으로 판정되고, 시험은 재 실시 되어야 한다. 만약 어떤 시험물질의 반복한 실험 중 조직 시료간의 차이가 허용범위를 벗어나면, 그 시험물질에 대한 실험은 “부적합”으로 간주되어야 하고, 그 시험물질은 재시험을 수행해야한다.

6. 결과 해석 및 예측 모델 (Interpretation of Results and Prediction Model)

가. 각 시험물질에 대한 반복 조직 추출물에서 얻은 흡광도 값/피크면적 값은 100%를 기준으로 하는 음성대조군의 값에 대한 평균 조직생존율(%)을 계산하기 위해 사용되어진다. 분류가 필요치 않는 물질로부터 분류가 필요한 물질을 구별하는 조직생존율의 기준 값은 60%이다. 따라서 결과는 다음과 같이 해석한다.

- 노출 및 노출-후 배양한 후 평균 조직생존율이 60%를 초과하면 그 시험물질은 UN GHS에 따른 분류와 표시가 필요하지 않은 물질(No Category)로 분류한다. 이 경우, 추가 시험은 필요하지 않다.
- 노출 및 노출-후 배양한 후 평균 조직생존율이 60% 이하(\leq)이면 그 시험물질은 잠재적으로 UN GHS에 따른 분류와 표시가 필요한 물질(Category 2 또는 1)로 분류한다. 최종 평균 조직생존율이 60% 이하(\leq)이면 다른 시험법을 사용하여 추가시험이 요구된다. 왜냐하면 EpiOcular™ EIT은 몇몇 물질에 있어서 위양성 결과를 보이기도 하며(II-6항 참조), UN GHS Category 1과 2사이를 구별할 수 없기 때문이다 (II-7항 참조).

나. 어떤 시험물질의 시험결과가 명백할 경우, 최소 2개의 조직 시료들로 구성된

한 번의 실험이면 충분하다. 하지만 반복된 시험결과가 일치하지 않거나 평균 조직생존율이 $60 \pm 5\%$ 를 보이는 경우와 같이, 기준 값과 근접한 값을 갖는 경우 두 번째 시험을 수행해야 하며, 수행된 두 시험 간의 결과가 일치하지 않는 경우에는 세 번째 시험을 실시해야 한다.

다. 특정 종류의 혼합물의 경우, 이러한 혼합물에 대한 시험법의 예측력을 높이기 위해, 기준치에 대한 적절하고 타당한 근거가 있을 경우, 분류가 필요치 않는 물질들로부터 분류가 필요한 물질들을 구별하기 위한 다른 조직생존율 기준치(cut-off values)가 고려될 수도 있다(II-6항 참조). 기준물질(Benchmark chemicals)은 특정 화학물질 또는 제품 그룹으로부터 알려지지 않는 물질에 대한 심한 안 손상/안 자극을 일으키는지를 평가하는데 유용하며 또한, 양성반응의 특정 범위 내에서 분류된 물질의 상대적인 안 독성을 평가하는데 유용할 수 있다.

VII. 시험결과(data) 및 보고

1. 시험결과

반복 조직시료로부터 얻어지는 매 회 시험결과들(예, 흡광도 (O.D) 값 / 포르마잔 피크 면적 값, 계산된 시험물질과 대조군에 대한 조직생존율(%), 및 최종 EpiOcular™ EIT 예측결과)은 각 시험물질에 대한 반복된 시험결과를 포함하며, 표 형식으로 보고해야 한다. 또한 각각의 시험 물질과 대조군에 대한 평균 조직생존율, 반복시험간의 차이 (2회 반복된 조직시료인 경우) 또는 표준편차(3회 이상 반복된 조직시료인 경우)를 보고해야 한다. 각각의 수행된 시험물질에 있어서, 색 간섭이나 직접적인 MTT 환원을 통해 MTT 포르마잔 측정을 방해하는 시험물질들이 있는지를 보고해야 한다.

2. 시험보고서

시험보고서는 다음과 같은 정보들을 포함하여야 한다.

가. 시험물질

- 단일성분으로 구성된 화합물
 - 화학적 정보(IUPAC 또는 CAS 등록명, CAS 등록번호, SMILES 또는 InChI 코드, 구조식 및/또는 다른 식별자료)
 - 물리적 상태, 휘발성, pH, LogP, 분자량, 화학적 분류, 시험수행과 관련된 추가적인 물리화학적 특성
 - 순도, 불순물에 대한 적절한 화학물질 정보
 - 해당하는 경우 시험 전처리 방법 (예, 가온, 분쇄)
 - 저장 조건 및 안정성 (알려져 있을 경우)
- 다성분 화합물, UVCB 및 혼합물
 - 구성물질의 알려진 화학적 정보(위 참고), 순도, 양적비율, 연관된 물리화학적 특성(위 참고) 등의 정보
 - 물리적 상태 및 시험 수행과 관련된 부가적인 물리화학적 특성
 - 순도, 불순물에 대한 적절한 화학적 정보
 - 해당하는 경우 시험 전처리 방법 (예, 가온, 분쇄)
 - 저장 조건과 안정성 (알려져 있을 경우)

나. 양성대조군과 음성대조군

- 화학적 정보(IUPAC 또는 CAS 등록명, CAS 등록번호, SMILES 또는 InChI 코드, 구조식 및/또는 다른 식별자료)
- 물리적 상태, 휘발성, pH, LogP, 분자량, 화학적 분류, 시험수행과 관련된 추가적인 물리화학적 특성(알려져 있을 경우)
- 순도, 불순물에 대한 적절한 화학적 정보

- 해당하는 경우 시험 전 처리 사항(예: 가온, 분쇄)
- 저장조건과 안정도(알려져 있을 경우)
- 초순수(ultrapure water) 이외 다른 음성대조군 사용에 대한 타당한 이유(해당하는 경우)
- 원액 메칠아세테이트 이외 다른 양성대조군 사용에 대한 타당한 이유(해당하는 경우)
- 적합한 허용기준을 입증할 수 있는 기존 양성대조군과 음성대조군의 결과에 대한 참고문헌

다. 시험의뢰기관과 시험기관에 대한 정보

- 시험의뢰기관, 시험기관, 및 연구책임자의 이름과 주소 등

라. 사용한 RhCE 조직 모델 및 시험법(해당하는 경우, 선정 근거 제공)

마. 시험조건

- 사용한 RhCE 조직 모델(생산배치 번호 포함)
- MTT 포르마잔 정량에 사용된 과장과 통과주파수대영역(해당하는 경우), 측정 기기(예, 분광광도계)의 직선 범위
- MTT 포르마잔 정량에 사용된 방법에 대한 설명
- HPLC/UPLC-분광광도계의 적격성 평가에 대한 설명(해당하는 경우)
- 특정 RhCE 조직 모델의 성능을 포함한 상세한 배경 정보

최소한 다음 사항을 포함해야 함

- i) 생존율
 - ii) 장벽 기능
 - iii) 형태학 특징(해당하는 경우)
 - iv) 재현성 및 예측력
 - v) RhCE 조직모델의 품질관리(QC)
- RhCE 조직 모델의 이력에 참고자료. 최소한 다음 사항을 포함해야 함

i) 배치별 모델 이력에 근거한 품질관리 데이터 허용기준

- 시험법 사용 전 숙련도 확인용 물질에 대한 평가로 시험법 수행의 숙련도 입증

바. 시험 수행 및 허용기준

- 기존 시험결과 자료에 근거한 양성대조군과 음성대조군의 평균 및 허용범위
- 양성 및 음성대조군에 대한 반복 조직시료간의 허용되는 범위
- 시험물질에 대한 반복 조직 시료들 간의 허용되는 범위

사. 시험 절차

- 사용한 시험절차의 세부사항
- 사용한 시험물질과 대조군 물질의 용량
- 노출, 노출-후 담금과 노출-후 배양단계의 온도와 지속시간 (해당하는 경우)
- 시험절차 상에서 변경된 모든 사항에 대한 설명
- 직접적 MTT 환원제 및/또는 색상을 띠는 시험물질에 사용된 대조군에 대한 설명 (해당하는 경우)
- 시험물질이나 대조군물질 당 사용된 반복 조직시료 수(양성대조군, 음성대조군, NSMTT, NSC_{living}, NSC_{killed})
- 예측 모델에 있어서 기준치 선정에 대한 타당성을 포함한 판정기준에 대한 설명

아. 결과

- 매 회차마다 얻어지는 시험물질 및 대조군 물질에 대한 표형식의 시험결과 (해당하는 경우 반복실험 포함, OD 또는 MTT 포르마잔 피크 영역, 조직 생존율, 평균 조직생존율, 반복 조직시료간의 편차 또는 표준편차, 최종 예측력 포함)
- 해당하는 경우, MTT 환원제 및/또는 색상을 띠는 시험물질에 사용된 대조군들의 결과 (OD 또는 MTT 포르마잔 피크면적, %NSMTT, %NSC_{living}, %NSC_{killed}, 반복

조직시료 간의 편차 또는 표준편차, 최종 보정 조직생존율, 최종 예측력 포함)

- 시험 회차 및 허용기준에 관한 시험물질과 대조물질들로부터 얻어진 결과
- 관찰된 다른 영향에 대한 설명 (예, 색상이 있는 시험물질에 의한 조직 착색)

자. 시험결과의 토의

차. 결론

VIII. 용어의 정의

1. **정확도(Accuracy)** : 시험결과와 허용된 참고치의 일치 정도. 시험 수행에 대한 평가 척도이고 “상관성(relevance)”의 한 측면이다. 정확도는 정확하게 맞춘 시험결과의 비율을 의미하는 “일치도(concordance)”와 흔히 같은 의미로 쓰임
2. **기준물질(Benchmark chemical)** : 시험물질의 비교 기준으로 사용되는 물질이다. 기준물질은 다음의 특성을 가져야 한다; (i) 일관성 있고 신뢰할 수 있는 공급원; (ii) 시험되는 물질과 구조적, 기능적, 화학적 또는 제품군의 유사성; (iii) 알려진 물리화학적 특성; (iv) 알려진 효과 입증 자료; (v) 원하는 반응의 범위 내 알려진 효력
3. **상향식 접근방식(Bottom-Up approach)** : 안 자극 또는 심한 안 손상을 유발하지 않는 화학물질에 대한 단계적 접근. 양성의 결과가 나오는 다른 화학물질로부터 음성의 결과가 나오는 분류 및 표시가 필요하지 않은 화학물질을 구별하는 것으로 시작함
4. **화학물질(Chemical)** : 단일물질 또는 혼합물
5. **일치도(Concordance)** : “정확도” 참고
6. **각막(Cornea)** : 홍채와 동공을 덮으며 빛을 내부로 받아들이는 안구 전면의 투명한 부분
7. **CV(Coefficient of Variation)** : 변동계수
8. **Dev(Deviation)** : 편차
9. **EIT(Eye Irritation Test)** : 안자극시험법
10. **유럽 동물대체시험법검증센터(EURL ECVAM)** : European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing
11. **안 자극(Eye Irritation)** : 눈 전면에 시험물질 적용 후 나타나는 눈의 변화로 적용 후 21일 안에 완전히 회복될 수 있는 것을 의미한다. “눈에 미치는 가역적 영향”과 “UN GHS Category 2”와 같은 의미로 사용함⁽¹⁾

12. **ET₅₀** : 기준물질을 정해진 특정 농도로 적용했을 때 조직생존율을 50%까지 감소시키는데 필요한 시험물질 노출시간
13. **위음성율(False negative rate)** : 시험법에 의해 음성물질로 잘못 판정되는 양성물질의 비율이며, 시험법 수행 지표 중 하나임
14. **위양성율(False positive rate)** : 시험법에 의해 양성물질로 잘못 판정되는 음성물질의 비율이며, 시험법 수행 지표 중 하나임
15. **유해성(Hazard)** : 어떤 물질이 생명체, 생태계 또는 특정 인구집단에 노출될 때 위대한 영향을 줄 가능성이 있는 물질 또는 상황(situation)의 본질적인 특성
16. **HPLC** : 고성능 액체크로마토그래피(High Performance Liquid Chromatography)
17. **무제한 용량(Infinite dose)** : RhCE 조직모델의 상피 표면을 완전히 균일하게 덮는데 필요한 양을 초과하는 RhCE 조직 모델에 적용되는 실험물질의 용량을 말함
18. **눈에 미치는 비가역적 영향** : “심한 안손상” 참고
19. **LLOQ** : 최소 정량 한계 (Lower Limit of Quantification)
20. **LogP** : 옥탄올-물 분배계수의 로그치
21. **ME** : 매트릭스 효과 (Matrix Effect)
22. **혼합물(Mixture)** : 서로 반응 하지 않는 두 개 이상의 물질로 구성된 혼합물 또는 용액⁽¹⁾
23. **단일성분 화합물(Mono-constituent substance)** : 정량적 구성으로 정의되며, 하나의 주요 구성성분이 최소 80% (w/w)이상으로 존재하는 물질
24. **다성분 화합물(Multi-constituent substance)** : 정량적 구성으로 정의되며 두 가지 이상의 주요성분의 양이 $\geq 10\%$ (w/w) 및 $< 80\%$ (w/w)인 물질. 다성분 물질은 생산과정의 산물이다. 혼합물과 다성분 물질의 차이는 혼합물은 두 가지 이상의 물질을 화학반응 없이 혼합하여 얻어지고, 다성분 물질은 화학반응의 산물임

25. MTT : 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide;
Thiazolyl blue tetrazolium bromide
26. 음성대조군(Negative control) : 시험계의 모든 구성성분을 포함하며 양성반응을 야기하지 않는 물질로 처리된 샘플. 시험물질과 다른 대조군 물질과 같이 실험되며 100% 조직생존율을 결정하기 위해 사용됨
27. 미분류(Not classified) : 안 자극(UN GHS Category 2, 2A 또는 2B) 또는 심한 안 손상(UN Category 1)으로 분류되지 않은 화학물질. “UN GHS No Category” 의미와 바꾸어 사용할 수 있음
28. NSC_{killed} : 죽은 조직에서의 비특이적 색상 (Non-Specific Colour in killed tissues)
29. NSC_{living} : 생존하는 조직에서의 비특이적 색상 (Non-Specific Colour in living tissues)
30. NSMTT : 비특이적 MTT 환원 (Non-Specific MTT reduction)
31. OD : 흡광도 (Optical density)
32. 유사시험법평가기준(Performance Standards) : 과학적으로 검증된 시험법에 기반 하여 제안된 시험법이 검증된 시험법과 기술적, 기능적으로 유사한 정도를 평가하기 위해 제공되는 기준. 여기에는 (1) 필수적인 시험법의 구성요소, (2) 검증된 시험법이 수행에 적합하다는 것을 증명하는데 사용된 시험물질 중에서 선택한 최소한의 참고물질 목록, (3) 최소한의 참고물질 목록을 이용하여 제안된 시험법을 평가하였을 때 제안된 시험법이 증명해야 하는 정확성 및 신뢰성의 수준. 이러한 정확성 및 신뢰성은 기존의 검증된 시험법에서 얻어진 수준을 근거로 함⁽¹⁶⁾
33. 양성대조군(Positive control) : 시험계의 모든 구성요소를 포함하고 시험계에서 양성반응을 유도한다고 알려진 물질로 처리한 샘플. 시험물질 그리고 다른 대조물질과 같이 실험된다. 시간에 따른 양성대조군 반응의 변동성을 평가할 수 있으며, 양성반응의 범위가 초과해서는 안됨
34. 상관성(Relevance) : 시험법과 관심 있는 결과 사이의 관계에 대한 기술. 시험법이 특정 목적에 의미 있고 유용한지에 대한 기술. 상관성은 시험법이 알고자 하는

생물학적 반응을 정확하게 측정하고 예측하는 지를 나타내며, 또한 시험법의 정확성(일치도)을 내포함

35. **신뢰도(Reliability)** : 동일한 시험방법에 따라 반복 시행하였을 때 동일 실험실과 다른 실험실에서 시험법을 재현할 수 있는 정도. 신뢰도는 실험실 내 실험실 간 재현성(reproducibility)과 실험실 내 반복성(repeatability)으로 평가됨⁽¹⁶⁾
36. **대체시험(Replacement test)** : 위험성 확인이나 위해성 평가를 위하여 일상적으로 사용하는 시험을 대체하기 위하여 고안된 시험. 인체나 동물의 건강 또는 환경을 보호하기 위하여 가능한 모든 시험상황과 물질을 고려하여 기존방법과 비교하였을 때 동등한 또는 개선된 방법일 때 사용함⁽¹⁶⁾
37. **재현성(Reproducibility)** : 동일한 시험방법에 따라 동일한 시험물질에 대한 반복 시험으로 얻은 결과의 일치 정도 (“신뢰도” 참고)⁽¹⁶⁾
38. **눈에 미치는 가역적인 영향(Reversible effects on the eye)** : “안 자극(Eye irritation) 참고”
39. **RhCE** : 인체각막유사상피모델(Reconstructed human Cornea-like Epithelium)
40. **Run** : 음성대조군과 양성대조군과 같이 시험되는 하나 이상의 시험물질로 구성됨
41. **SD(Standard Deviation)** : 표준 편차
42. **민감도(Sensitivity)** : 시험 결과 양성/활성 시험물질이 양성/활성으로 정확하게 분류되는 비율. 시험물질의 분류를 결정하는 시험법에 대한 정확성의 척도이며 시험법의 상관성을 평가하는데 중요한 고려사항임⁽¹⁶⁾
43. **심한 안손상(Serious eye damage)** : 안구 앞면에 시험물질 적용 후 21일 이내에 완전히 회복되지 않는 안 조직 손상 또는 시력의 심각한 손상으로, “눈에 미치는 비가역적 영향”과 “UN GHS Category 1”와 바꾸어 사용할 수 있음
44. **표준작업지침서(Standard Operating Procedure, SOP)**: 규칙적이고 분명하게 시험법에 맞게 실험이 진행 되었는가 대하여 자세하게 설명하기 위한 절차로 공식적인 서면으로 되어있으며, GLP에서 요구됨
45. **특이성(Specificity)**: 시험 결과 음성/비활성 시험물질이 음성/비활성으로 정확하게

분류되는 비율. 시험물질의 범주를 결정하는 시험법에 대한 정확성의 척도이며 시험법의 상관성을 평가하는데 중요한 고려사항⁽¹⁶⁾

46. **화합물(Substance)** : 생산과정을 통해 얻어지거나 또는 천연상태로 얻는 화학 원소들(elements)과 이들로 이루어진 구성물질(compound). 생산품의 안정성을 유지시키는데 필요한 모든 첨가제와 생산과정에서 유래하는 불순물을 포함한다. 그러나 해당물질의 안정성이나 그 조성의 변화에 영향을 주지 않고 분리 될 수 있는 용매는 제외함⁽¹⁾
47. **시험(Test)** : SOP에 정의된 바와 같이 최소 2개 이상의 반복 조직시료에서 동시에 시험된 단일 시험물질
48. **조직생존율(Tissue viability)** : 조직 모델에서 세포 군집(cell population)의 총 활성도를 측정하는 지표(예, 생체 염료인 MTT를 환원하는 능력)로서 살아있는 세포의 활성도 및 총 숫자와 관련 있으며, 측정된 평가 항목과 사용된 시험방법에 따라 다를 수 있음
49. **하향식 접근방식(Top-Down approach)** : 심한 안 손상을 유발할 것으로 추정되는 화학물질에 대한 단계적 접근법. 음성의 결과가 나오는 다른 화학물질(음성 반응)로부터 심한 안 손상을 유발하는 양성(양성 반응)의 결과가 나오는 화학물질을 구별하는 것으로 시작됨
50. **시험물질(Test chemical)** : 시험법에서 평가되는 화학물질
51. **단계적 시험전략(Tiered testing strategy)** : 시험물질에 대한 기존의 모든 정보를 순차적인 순서에 따라 검토하는 단계적인 시험전략. 다음 단계로 진행하기 전에 위험분류를 결정하기 위한 충분한 정보가 있는가를 각 단계별로 가중치를 두어 검토한다. 예를 들어 시험물질의 위험 가능성이 기존 자료를 근거로 평가될 수 있다면, 추가적인 시험이 필요하지는 않음⁽¹⁶⁾
52. **ULOQ(Upper Limit of Quantification)** : 최대 정량 한계
53. **유엔의 화학물질의 분류 및 표시에 관한 국제조화시스템 [United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, (UN GHS)]**: 물리적, 보건적, 환경적 위험성의 수준 및 표준화된

유형에 따른 화학물질(단일물질 또는 혼합물질)의 분류체계로 픽토그램, 표시방법, 위해에 대한 사항, 사전주의 사항, 안전성 자료 기록지와 같은 해당하는 소통 방식을 통해 화학물질의 유해 정보를 전달하고, 사람(고용주, 근로자, 운송자, 소비자, 응급처치자 등)과 환경을 보호하고자 제시된 체계⁽¹⁾

54. UN GHS Category 1 : “심한 안 00손상”항 참고
55. UN GHS Category 2 : “안 자극”항 참고
56. UN GHS No Category : UN GHS Category 1 또는 2 (2A 또는 2B)로 분류되지 않은 화학물질. “미분류(Not Classified)”와 바꾸어 사용할 수 있음
57. UPLC(Ultra-High Performance Liquid Chromatography) : 초고성능 액체 크로마토그래피
58. UVCB(Substances of unknown or variable composition, complex reaction products or biological materials) : 조성이 알려져 있지 않거나 다양한 조성으로 이루어진 화합물, 복잡한 반응산물, 또는 생물학적 물질
59. 타당한 시험법(Valid test method) : 특정한 목적에 대한 신뢰도와 상관성을 가진 것으로 간주되는 시험법으로 과학적으로 타당한 원리에 근거한다. 시험법은 절대적으로 유효할 수 없고 정해진 목적과 관련해서만 유효⁽¹⁶⁾
60. 검증된 시험법(Validated test method) : 특정한 목적에 대한 신뢰도와 상관성(정확도 포함)을 평가하기 위한 검증연구를 마친 시험법. 검증된 시험법이 제안된 목적에서 허용되는 정확도와 상관성 측면에서 충분한 성능을 보이지 않을 수 있다는 것을 주의해야함
61. VRM(Validated Reference Method) : 검증된 참고시험법
62. 증거의 가중치(Weight-of-evidence) : 시험물질의 잠재적인 유해성에 관한 결론에 도달하기 위해 활용되는 다양한 정보들의 확실성과 결점을 고려하는 과정

IX. 참고문헌

1. UN. (2013). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30, Fifth Revised Edition, New York and Geneva: United Nations. Available at: [http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/English/ST-SG-AC10-30-Rev5e.pdf].
2. OECD. (2012). Acute Eye Irritation/Corrosion Guideline for Testing of Chemicals No. 405. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
3. OECD. (2013). Guidelines for Testing of Chemicals (No.437.): Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
4. OECD. (2013). Guideline for Testing of Chemicals (No. 438): Isolated Chicken Eye Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
5. OECD. (2012). Fluorescein Leakage Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 460. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

6. Freeman, S.J., Alépée N., Barroso, J., Cole, T., Compagnoni, A., Rubingh, C., Eskes, C., Lammers, J., McNamee, P., Pfannenbecker, U., et Zuang, V. (2010). Prospective Validation Study of Reconstructed Human Tissue Models for Eye Irritation Testing. *ALTEX* 27, Special Issue 2010, 261-266.
7. EC EURL ECVAM. (2014). Validation Study Report on the EURL ECVAM - Cosmetics Europe Prospective Validation Study of Reconstructed Human Corneal Epithelium-Based Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Serious Eye Damage/Eye Irritation Testing.
8. EC EURL ECVAM. (2014). Eye Irritation *In Vitro* Assay Validation: Selection of Test Item Chemicals (EpiOcular™ Eye Irritation Test and SkinEthic™ Human Cornea Epithelium). Validation Management Group report.
9. TNO. (2014). Eye Irritation Validation Study on Human Tissue Models: Statistical Analysis and Reporting on the EpiOcular™ EIT. TNO Report TNO2013 R10396 Final, pp. 165.(Manuscript in Preparation).
10. EC EURL ECVAM. (2014). Eye Irritation Validation Study (EIVS): Statistical Analysis of the Data Generated Under SOP ver 8.0 of EpiOcular™ EIT (Solid Test Substances, Laboratory Beiersdorf), pp.21.
11. EC EURL-ECVAM. (2014). Recommendation on the Use of the EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Serious Eye Damage/Eye

Irritation According to UN GHS.

12. Draize J.H., Woodard G., and Calvery H.O. (1944). Methods for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membranes. *Journal of Pharmacol. and Exp. Therapeutics* 82, 377-390.
13. 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., et 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.
14. Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
15. OECD. (2014). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Cornea-Like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage, Based on the Validated Reference Method EpiOcular™ EIT described in TG 492. Series on Testing and Assessment No. 216, OECD, Paris. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. (Manuscript in Preparation).

16. OECD. (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 34.). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris
17. Kaluzhny Y., Kandárová, H., Hayden, P., Kubilus, J., d'Argembeau-Thornton, L., et Klausner, M. (2011). Development of the EpiOcular™ Eye Irritation Test for Hazard Identification and Labelling of Eye Irritating Chemicals in Response to the Requirements of the EU Cosmetics Directive and REACH Legislation. *Altern. Lab. Anim.* 39,339-64.
18. Pfannenbecker, U., Bessou-Touya, S., Faller, C., Harbell, J., Jacob, T., Raabe, H., Tailhardat, M., Alépée, N., De Smedt, A., De Wever, B., Jones, P., Kaluzhny, Y., Le Varlet, B., McNamee, P., Marrec-Fairley, M., et Van Goethem, F. (2013). Cosmetics Europe multi-laboratory pre-validation of the EpiOcular™ reconstituted Human Tissue Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. in Vitro* 27,619-626.
19. Kolle S.N., Moreno, M.C.R., Mayer, W., van Cott, A., van Ravenzwaay, B., et Landsiedel, R. (2015). The EpiOcular™ Eye Irritation Test is the Method of Choice for *In Vitro* Eye Irritation Testing of Agrochemical Formulations: Correlation Analysis of EpiOcular™ Eye Irritation Test and BCOP Test Data to UN GHS, US EPA and Brazil ANIVSA Classifications. *ATLA* 43, 1-18.

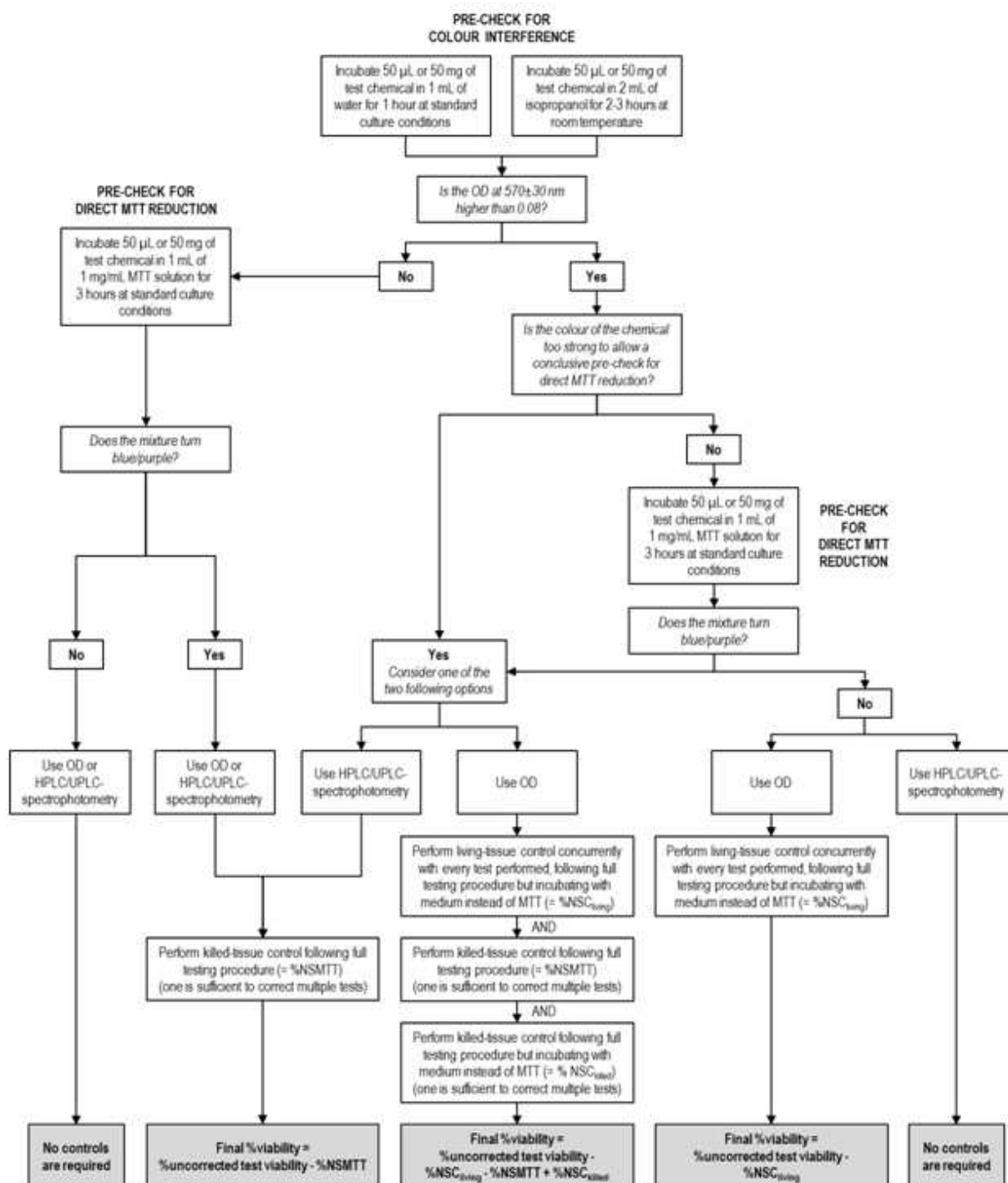
20. Adriaens, E., Barroso, J., Eskes, C., Hoffmann, S., McNamee, P., Alépée, N., Bessou-Touya, S., De Smedt, A., De Wever, B., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., et Zuang, V. (2014). Retrospective Analysis of the Draize Test for Serious Eye Damage/Eye Irritation: Importance of Understanding the *In Vivo* Endpoints Under UN GHS/EU CLP for the Development and Evaluation of *In Vitro* Test Methods. *Arch.Toxicol.* 88,701-23.
21. Hackett R.B., and McDonald T.O. (1991). Eye Irritation. In *Advances in Modern Toxicology: Dermatotoxicology* Marzulli F.N. and Maibach H.I. (Eds.), 4th Edition, pp. 749-815. Washington, DC, USA: Hemisphere Publishing Corporation.
22. Fox D.A., and Boyes W.K. (2008). Toxic Responses of the Ocular and Visual System. In Cassaret and Doull's *Toxicology: The Basic Science of Poisons* Klaassen C.D.(Ed.), 7th Edition, pp. 665-697. Withby, ON, Canada: McGraw-Hill Ryerson.
23. Jester J.V., Li, H.F., Petroll, W.M., Parker, R.D., Cavanagh, H.D., Carr, G.J., Smith, B., et Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant Induced Corneal Injury Correlates with Cell Death. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39,922-936.
24. 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.

25. Jester J.V., Li, L., Molai, A., et Maurer, J.K. (2001). Extent of Corneal Injury as a Mechanistic Basis for Alternative Eye Irritation Tests. *Toxicol. in Vitro* 15,115–130.
26. Jester J.V., Petroll, W.M., Bean, J., Parker, R.D., Carr, G.J., Cavanagh, H.D., et Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant-Induced Corneal Injury Predicts Extent of Subsequent Ocular Responses. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 2610–2625.
27. Jester J.V. (2006). Extent of Corneal Injury as a Biomarker for Hazard Assessment and the Development of Alternative Models to the Draize Rabbit Eye Test. *Cutan. Ocul. Toxicol.*, 25, 41–54.
28. EpiOcular™ EIT SOP, Version 8. (March 05, 2013). EpiOcular™ EIT for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Available at: [<http://www.ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>].
29. Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., and McNamee, P. (2015). Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT-Reduction Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol In Vitro*, 29(4). Pp 741–61.
30. Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Handa, Y., DeLuca, J., Truong, T., Hunter, A., Kearney, P., d'Argembeau-Thornton, L., et Klausner, M.

(2014). EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) for Hazard Identification and Labeling of Eye Irritating Chemicals: Protocol Optimization for Solid Materials and Extended Shipment Times. *Altern Lab Anim*, 3(2), pp.101-27.

31. US FDA. (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. May 2001. Available at:
[\[http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf\]](http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf).
32. OECD. (2015). Short Time Exposure *In Vitro* Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 491. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris

부록 1. VRM SOP에 근거하여 직접적인 MTT 환원제나 색 간섭 물질을 구별하고 관리하는 순서도



부록 2. RhCE 조직모델에서 추출된 MTT 포르마잔 정량을 위한 HPLC/UPLC-분광광도계 관리의 주요 측정인자와 허용기준

Parameter	Protocol Derived from FDA Guidance(29)(31)	Acceptance Criteria
Selectivity	Analysis of isopropanol, living blank (isopropanol extract from living RhCE tissue constructs without any treatment), dead blank (isopropanol extract from killed RhCE tissue constructs without any treatment), and of a dye (e.g., methylene blue)	$Area_{interference} \leq 20\% \text{ of } Area_{LLOQ}^1$
Precision	Quality Controls (i.e., MTT formazan at 1.6 µg/mL, 16 µg/mL and 160 µg/mL) in isopropanol (n=5)	CV ≤ 15% or ≤ 20% for the LOQ
Accuracy	Quality Controls in isopropanol (n=5)	%Dev ≤ 15% or ≤ 20% for LLOQ
Matrix Effect	Quality Controls in living blank (n=5)	85% ≤ %Matrix Effect ≤ 115%
Carryover	Analysis of isopropanol after an ULOQ ² standard	$Area_{interference} \leq 20\% \text{ of } Area_{LLOQ}$
Reproducibility (intra-day)	3 independent calibration curves (based on 6 consecutive 1/3 dilutions of MTT formazan in isopropanol starting at ULOQ, i.e., 200 µg/mL) Quality Controls in isopropanol (n=5)	Calibration Curves: %Dev ≤ 15% or ≤ 20% for LLOQ
Reproducibility (inter-day)	Day 1 : 1 calibration curve and Quality Controls in isopropanol (n=3) Day 2 : 1 calibration curve and Quality Controls in isopropanol (n=3) Day 3 : 1 calibration curve and Quality Controls in isopropanol (n=3)	Quality Controls: % Dev ≤ 15% and CV ≤ 15%
Short Term Stability of MTT Formazan in RhCE Tissue Extract	Quality Controls in living blank (n=3) analysed the day of the preparation and after 24 hours of storage at room temperature	%Dev ≤ 15%
Long Term Stability of MTT Formazan in RhCE Tissue Extract, if required	Quality Controls in living blank (n=3) analysed the day of the preparation and after several days of storage at -20 °C	%Dev ≤ 15%

¹LLOQ : 하한정량한계, 1-2% 조직생존율에 해당됨. 즉, 0.8 µg/mL.

²ULOQ : 상한 정량한계, 음성대조군 이소프로판올 추출물들의 농도 중 가장 높을 것으로 기대되는 MTT 포르마잔 농도보다 적어도 2배가 높은 것으로 정의됨(~70 µg/mL in the VRM), 즉 200 µg/mL

화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인(IX)

발 행 일 2016월 9월

발 행 처 식품의약품안전처
식품의약품안전평가원 바이오생약심사부 화장품심사과

편 집 위 원 최보경, 이정표, 김정근, 김도정, 정성희, 권경진, 김선희,
이주연, 박소영 (화장품심사과)
이종권, 김태성, 김주환, 고경육, 이정선, 안일영
(특수독성과)
