

발간등록번호

11-1471057-000513-14

화장품 등 안자극 동물대체시험법
(*In vitro* 고분자 시험법: Ocular Irritation[®])
가이드라인
(민원인 안내서)

2021. 9.



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

독성평가연구부 특수독성과

지침서·안내서 제·개정 점검표

명칭

화장품 안자극 동물대체시험법(*In vitro* 고분자 시험법: Ocular Irritection®)
가이드라인(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.		
2021년 9월 17일		
담당자 확 인(부서장)		강남희 김광진

이 안내서는 화장품 안자극 동물대체시험법(*In vitro* 고분자 시험법: Ocular Irritaction®) 가이드라인에 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 2021년 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: 043-719-5153, 5155

팩스번호: 043-719-5150

제·개정 이력

연번	제·개정번호	승인일자	주요내용
1	안내서-1150-01	2021.9.	화장품 안자극 동물대체시험법 가이드라인(민원인 안내서) 제정

목 차

I. 개요	6
II. 시험원리	6
III. 제한점 및 고려사항	6
IV. 시험방법	7
V. 결과 판정	9
VI. 시험결과 및 보고	11

- 별첨 1 : 번역본 (OECD TG 496)
- 별첨 2 : 원문 (OECD TG 496)

화장품 안자극 동물대체시험법 (*In vitro* 고분자 시험법: Ocular Irritation®) 가이드라인

I. 개요

In vitro 고분자 시험법은 각막을 구성하는 단백질과 유사한 성질의 고분자 매트릭스(macromolecular matrix)에 시험물질을 적용한 후 발생하는 혼탁도로 안자극을 예측하는 생체외(*in vitro*) 시험법이다.

고분자 매트릭스(macromolecular matrix)는 안자극이 나타나는 시험물질에 노출되면 배열된 구조가 파괴되면서 혼탁해 진다. 본 시험법은 이 혼탁도를 분광분석기로 측정하여 UN GHS 기준에 따라 1) 심한 안 손상을 유발하는 물질(category 1) 2) 안자극 또는 심한 안 손상으로 분류되지 않는 물질(no category)을 식별하는 시험법이다.

II. 시험원리

본 시험법의 원리는 안자극 물질에 의한 각막 변성, 폴림(unfolding) 및 형태의 변화 등으로 나타나는 각막 손상을 예측하는 것이다. 정상적인 인체 각막은 많은 종류의 단백질과 탄수화물로 구성되며 고도로 잘 배열된 구조를 이루어 투명하게 보이지만 안자극 시험물질에 노출되면 각막의 단백질이 시험물질과 반응하여 배열된 구조가 파괴되고 침전물이 발생하여 각막이 혼탁해진다. 이러한 각막의 혼탁 정도를 인체 각막과 유사하게 구성된 고분자 매트릭스에 시험물질을 적용한 후 405 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 평가한다.

III. 제한점 및 고려사항

본 시험법은 시험물질 10% 수용액/분산액의 pH 범위가 4이상 9이하인 경우에 적용 가능하다. 계면활성제와 비계면활성제 모두 본 시험법에 적용가능하며 계면활성제 및 계면활성제와 유사한 특성을 가지는 시험물질은 증류수를 이용하여 5% working solution을 조제한 후 적용 가능하다. 고체물질은 비계면활성제의 경우 물에 대한 용해성 여부에 관계없이 본 시험법을 적용할 수 있으며, 액체물질은 점성의 유무와 관계없이 적용할 수 있다. 가스와 에어로졸은 아직 검증연구에서 평가되지

않아 적용할 수 없다. 또한, 진한 유색의 물질, 염색 침전을 유발하는 물질, 고농도의 일부 계면활성제 및 고휘발성 물질은 시험계를 간섭할 수 있으므로 본 시험법 적용에는 제한이 있다.

본 시험법은 상당수의 Category 1 물질을 Category 2, 2A 또는 2B로 과소분류하거나 No Category 물질을 Category 2, 2A 또는 2B로 과대분류 하므로 UN GHS Category 2(2A, 2B) 물질을 확인하기 위해서는 다른 시험법이 필요하다. 그러므로 Category 2(2A, 2B) 물질을 분류하기 위해서는 IATA 지침서에 따라 추가 정보 또는 다른 시험법으로 평가해야 한다.

IV. 시험방법

4.1 시험물질 준비

시험을 수행하기 전 시험물질의 특성을 확인하여 본 시험법이 해당 시험물질에 적합한지를 결정해야 한다. 시험물질 10% 수용액의 pH를 측정하여 적용 범위(pH 4.0~9.0) 내에 있는지 확인해야 한다. 또한, 시험물질의 계면활성제 특성 여부가 확인되지 않은 경우 거품형성시험(Foam test)을 실시해야 한다. 시험물질 10% 수용액을 10초간 혼합한 후 형성된 거품층의 비율과 지속성을 관찰하여 계면활성 여부를 결정한다.

계면활성 물질은 고분자 매트릭스를 준비하기 전에 미리 시험물질 용액을 준비한다. 액체물질의 경우 시험물질 0.5 mL을 증류수 9.5 mL에 넣어 5% working solution을 만든 후 2배 연속 희석하여 5개 농도(0.3125%, 0.625%, 1.25%, 2.5% 및 5%)의 시험물질 용액을 준비한다. 고체물질의 경우(예: 비누 바) 여러 다른 부위에서 채취한 시험물질 0.5 g을 증류수 10 mL에 넣어 5% working solution을 만든 후 2배 연속 희석하여 5개 농도의 시험물질 용액을 준비한다.

비계면활성 물질의 경우 액체 또는 고체시험물질을 원물질 그대로 5개의 연속되는 용량(25, 50, 75, 100 및 125 μ l 또는 mg)을 사용한다. 고체시험물질은 고분자 매트릭스를 준비하기 전에 미리 칭량하여 준비한다.

동시 대조군으로 Ocular Irritation[®] kit에 포함된 보정물질(calibrators) 4종 및 품질관리물질(quality controls) 2종을 사용한다. 보정물질은 UN GHS No Category에서 Category 1까지의 범위에 해당하는 물질들을 포함하며, IDE(Irritation Draize Equivalent) 점수를 계산하기 위한 표준 곡선을 설정하는데 사용된다.

4.2 고분자 매트릭스 준비

Ocular Irritection[®] 키트에 포함된 시약 분말(reagent powder)을 수화용액(hydrating solution)에 녹인 후 여과지를 이용하여 여과한다. 여과된 시약용액(reagent solution)의 pH와 온도를 측정하여 정해진 범위 내에 속하는지 확인한다(pH 7.9-8.2, 온도 20-25°C). 시약용액은 액티베이터 완충 용액(activator buffered solution)을 넣어 pH를 낮추고 규칙적인 구조의 고분자 매트릭스를 형성하도록 활성화시킨다. 활성화된 시약용액의 pH와 온도를 측정하여 정해진 범위 내에 속하는지 확인한다(pH 범위 6.4-6.7, 온도 범위 20-25°C). 블랭킹 버퍼(blanking buffer)에도 활성화 완충 용액을 넣은 후 활성화시킨다. 활성화된 시약용액과 블랭킹 버퍼를 24-well 플레이트의 해당되는 well에 1250 μ L씩 넣은 후 멤브레인 디스크(membrane disc)를 넣는다.

4.3 시험물질 및 대조물질 적용

비계면활성 시험물질의 경우 물리화학적 성질(고체 또는 액체)에 따라 다르게 적용한다. 액체시험물질은 25, 50, 75, 100 및 125 μ L 용량을 24-well 플레이트에 놓인 멤브레인 디스크 안에 적용한다. 고체시험물질은 25, 50, 75, 100 및 125 mg 용량을 멤브레인 디스크 안에 적용한 후 멤브레인 디스크를 24-well 플레이트에 넣는다.

계면활성 시험물질의 경우 5개 농도(0.3125%, 0.625%, 1.25%, 2.5% 및 5%)의 시험물질 용액 125 μ L를 24-well 플레이트에 미리 넣어둔 활성화된 시약용액 및 블랭킹 버퍼에 직접 적용한 후 멤브레인 디스크를 넣는다.

대조물질(보정물질 4종 및 품질관리물질 2종)은 125 μ L씩 24-well 플레이트의 멤브레인 디스크 안에 적용한다.

4.4 반응 및 흡광도 측정

시험물질 및 대조물질을 적용한 후 24-well 플레이트를 25 \pm 1°C 배양기에서 24시간(\pm 30분) 동안 반응시키고, 반응이 끝난 플레이트는 육안으로 관찰하여 멤브레인 디스크의 손상여부, 웰(well) 안의 용액 부피 감소를 확인한다. 웰(well) 안의 용액 부피가 감소한 경우 시험물질의 흡습성이 원인일 수 있으므로, 동일한 현상이 반복되면 해당 시험물질은 시험하지 않는다. 24-well 플레이트의 용액을 96-well 플레이트의 각 웰(well)에 250 μ L씩 넣은 후 405 nm 파장에서 흡광도를 측정한다.

4.5 IDE 점수 계산

IDE(Irritation Draize Equivalent) 점수는 다음과 같이 계산한다. 측정된 OD 값을 바탕으로 Irritection[®] 분석 소프트웨어 프로그램(In Vitro International 제공)을 사용하여 IDE 점수를 자동으로 계산할 수 있다.

(1) $OD_{QC\ 1, 2}$ 또는 $Net\ OD_X < OD_{cal\ 1}$ 인 경우

$$IDE = (OD_{QC\ 1, 2} \text{ 또는 } Net\ OD_X / OD_{cal\ 1}) \times 12.5$$

(2) $OD_{cal\ 1} < OD_{QC\ 1, 2}$ 또는 $Net\ OD_X < OD_{cal\ 2}$ 인 경우

$$IDE = [(OD_{QC\ 1, 2} \text{ 또는 } Net\ OD_X - OD_{cal\ 1}) / (OD_{cal\ 2} - OD_{cal\ 1})] \times 17.5 + 12.5$$

(3) $OD_{cal\ 2} < OD_{QC\ 1, 2}$ 또는 $Net\ OD_X < OD_{cal\ 3}$ 인 경우

$$IDE = [(OD_{QC\ 1, 2} \text{ 또는 } Net\ OD_X - OD_{cal\ 2}) / (OD_{cal\ 3} - OD_{cal\ 2})] \times 21.0 + 30$$

- * 시약 OD : 시약 용액이 담긴 well에 시험물질을 첨가한 후 측정된 값
- * Blank OD : Blanking buffer가 담긴 well에 시험물질을 첨가한 후 측정된 값
- * $OD_{QC\ 1, 2}$ 및 $OD_{cal\ 0, 1, 2, 3}$: 시약 용액이 담긴 well에 보정물질(QC1, QC2) 및 품질확인물질(Cal0, Cal1, Cal2, Cal3)을 첨가한 후 측정된 값
- * X : 시험물질의 용량 또는 농도
- * $Net\ OD_X = \text{시약 } OD_X - \text{blanking buffer } OD_X$

V. 결과 판정

5.1 결과 판정

각 시험물질(용량 또는 농도)의 IDE 점수 중 가장 큰 값인 MQS(Maximal Qualified Score) 값을 기준으로 표 1에 따라 시험물질의 안구 유해성을 판정한다.

표 1. 판정 기준

MQS	UN GHS 분류
0 ~ 12.5	No Category
>12.5 ~ 30.0	No prediction can be made
>30.0	Category 1

5.2 인정 요건

1) 시험결과는 다음의 2개 기준 중 1개 이상을 만족해야 한다.

- 4종 보정물질의 측정값이 모두 허용 범위 내에 있어야 하고, 품질관리물질 2종 중 최소 1종의 측정값이 허용 범위 내에 있어야 한다.
- 보정물질 4종 중 최소 3종의 측정값이 허용 범위 내에 있어야 하고, 2종 품질관리물질의 측정값이 모두 허용 범위 내에 있어야 한다.

표 1. 보정물질 및 품질관리물질의 인정 요건

OD ₄₀₅ 허용 범위	
보정물질 0	0.062 ~ 0.262
보정물질 1	0.089 ~ 0.315
보정물질 2	0.351 ~ 0.945
보정물질 3	1.277 ~ 2.127
IDE 허용 범위	
품질관리물질 1	7.2 ~ 20.8
품질관리물질 2	23.6 ~ 35.6

2) 시험결과는 다음의 기준을 만족하는 조건에서 MQS 값을 도출해야 한다.

- 시험물질의 Net OD 값($OD_{Net} = OD_{\text{reagent solution}} - OD_{\text{blanking buffer}}$)이 -0.015를 초과해야 한다($OD_{Net} > -0.015$).
- 시험물질의 Net OD 값이 Cal 2의 OD 값($OD_{cal 2}$) 미만인 경우 Kit에 제공되는 inhibition check 용액을 이용하여 고분자 매트릭스가 제대로 반응하는지 확인해야 한다. Inhibition check 용액을 넣은 후 다시 흡광도를 측정하여 OD 값이 $OD_{cal 2}$ 이상인지 확인한다.
- 각 시험물질의 용량/농도별 $OD_{\text{blanking buffer}}$ 값은 -50~500 범위 내에 있어야 한다. $OD_{\text{blanking buffer}}$ 값이 1.2를 초과하는 경우 시험물질로 인한 간

섭을 나타내며(예: 강한 발색) 해당하는 시험물질은 색간섭 확인을 위해 최소 1회 이상 재시험하며, 동일한 결과가 반복되면 해당 시험물질은 시험에서 배제한다.

- 용량-반응(dose response)을 확인하여 이례적/비전형적인 패턴을 보이는 경우 해당 IDE 결과를 MQS 결정에서 제외시킨다.

VI. 시험결과 및 보고

시험보고서에는 다음의 내용을 포함하도록 한다.

시험물질 및 대조물질

- IUPAC 명, CAS 명, CAS 번호, SMILES, InChI 코드, 구조식 등과 같은 화학 물질 식별 정보
- 시험/대조군물질, 복합물질의 경우 순도 및 물질 구성
- 다성분물질, UVCB의 경우 화학물질 정보(위 참조), 순도, 양적 비율, 구성성분의 관련 물리화학적 성질 등 알려진 특성
- 물리적 상태, 휘발성, pH, 안정성, 화학적 분류, 수용해도(water solubility), 색상, 광학 밀도, 흡광도 특성
- 시험물질 10 % 수용액의 pH, 거품형성시험 결과
- 시험 전 시험/대조 물질의 처리 내용(예: 가온, 분쇄)
- 저장 조건 및 안정성
- 용매 종류

시험의뢰자 및 시험기관과 관련한 정보

- 시험의뢰기간, 시험기관 및 연구 책임자의 이름 및 주소

시험 조건

- 사용한 시험법에 대한 설명
- 시간 경과에 따른 시험법의 수행능(정확도 및 신뢰도) 확인에 사용되는 절차 (예: 숙련도 물질의 주기적 시험)

시험 방법

- 시험에 사용된 용량/농도의 수
- 사용된 용매 및 기준(benchmark) 대조군의 식별정보
- 사용된 시험물질의 용량 및 적용(노출) 시간
- 시험절차 상에서 변경된 모든 사항에 대한 설명

결과

- 시험 수행(test run)의 인정 요건에 대한 결과를 포함한 보정물질과 품질관리물질의 OD₄₀₅ 표: 적격(qualified) 혹은 부적격(not-qualified) 분석
- 각각의 시험물질 용량에 대한 OD₄₀₅, Net OD₄₀₅ 및 IDE 점수의 표
- 시험물질에 대한 적용가능 기준 확인 결과: 제외된 결과 혹은 재시험을 위한 프롬프트(prompt)/플래그(flag) 문구
- 해당되는 경우, 재시험 결과
- 시험 절차의 끝에 관찰된 기타 효과에 대한 설명(예: 막의 온전함, 증발을 나타내는 플레이트 뚜껑 위 물방울, 용량 감소, 착색)
- Maximal Qualified Score(MQS) 및 해당 점수에서 예측되는 *in vitro* UN GHS Category

별첨 1. 번역본(OECD TG 496)

생체외(*in vitro*) 고분자 시험법 가이드라인

In vitro Macromolecular Test Method

생체외(*in vitro*) 안자극 시험법: 고분자 시험법

서론

1. 생체외(*in vitro*) 고분자 시험법인 Ocular Irritation(OI[®])은 심한 안손상 유발 가능성이 있는 화학물질(물질 및 혼합물)뿐 아니라 안자극 혹은 심한 안손상에 대한 분류가 필요하지 않은 화학물질을 식별하는데 사용 가능한 생화학적 생체외 시험법이다.
2. 단일 생체외 안자극 시험만으로는 다양한 화학물질을 대상으로 모든 범위의 기전적 측면(mechanistic aspects)을 통해 자극을 예측하는 생체내(*in vivo*) Draize 안자극 시험을 가까운 시일 내에 완전히 대체할 수 없다는 것이 일반적인 견해이다. 그러나 자극 가능성의 범위 및/또는 화학물질 등급을 결정하기 위해 통합독성평가(IATA) 내에서 안독성의 기전적 측면(mechanistic aspects)에 대한 기존 지식과 각각의 생체외 시험법의 장점을 결합하는 시험전략 내에서 대체시험법을 전략적으로 조합하면 UN 화학물질의 분류 및 표시에 관한 국제조화시스템(UN GHS)에 정의된 위험성 분류를 위한 안자극 Draize 시험법(2)(3)을 대체할 수 있다(1). 하향식 접근방식(Top-Down approach)은 기존 정보를 바탕으로 시험물질이 강한 자극을 가질 것으로 예상되는 경우에 사용하도록 고안된 반면 상향식 접근방식(Bottom-Up approach)은 기존 정보를 바탕으로 시험물질이 충분한 안자극을 유발하지 않을 것으로 예상되어 분류가 필요하지 않은 경우 사용하도록 고안되었다(2)(3).
3. 생체외 고분자 시험법은 7~12항에서 기술된 대로 화학물질의 안구 유해성 분류 및 표시에 대한 특정 상황에서 일부 제한점을 가진 생체외 시험법이다. 생체외 고분자 시험법은 생체내 토끼 안자극 시험을 단독으로 대체할 수 있다고 간주되지 않지만, 추가시험 없이 심한 안손상을 유발하는 화학물질, 즉 UN GHS category 1으로 분류되는 물질(1)을 식별하기 위해 OECD GD 263(2)에서 권장하는 하향식 접근방식의 첫번째 단계로서 권장된다. 또한 생체외 고분자 시험법은 UN GHS 정의에서 안자극 또는 심한 안손상에 대한 분류가 필요하지 않은 화학물질(No Category)(1)의 분류를 위한 상향식 접근방식

(OECD GD 263)(2)의 초기 단계로 사용될 수 있다. 그러나 심한 안손상(UN GHS Cat. 1)을 유발하는 것으로 예측되지 않는 화학물질이거나 안자극 또는 심한 안손상을 유발하지 않는(UN GHS No Cat.) 것으로 예측되지 않는 화학물질인 경우 확정적인 UN GHS 분류를 위해 본 시험법 외 추가 정보 및/또는 시험이 필요할 수 있다. 본 시험 가이드라인의 사용과 가장 적절한 시험법의 선택은 하향식 및 상향식 접근방식이 심한 안손상과 안자극에 대한 광범위한 통합독성평가(2)의 일부분을 나타내는 OECD GD 263의 맥락에서 고려되어야 한다.

4. 본 시험 가이드라인의 목적은 눈에 대한 시험물질의 잠재적인 유해성을 평가하기 위한 생체의 고분자 시험법의 절차를 설명하는 것이다. 각막 혼탁은 안구 유해성 분류(4)의 가장 중요한 요소로 설명된다. 각막 혼탁은 고분자(특히, 단백질)의 침전/변성(denaturation)으로 설명되는 응고(coagulation) 혹은 지질의 분해(breakdown)로 설명되는 비누화(saponification) 등을 통해 각막 단백질과 탄수화물의 고도로 조직화된 구조에 시험물질이 미치는 파괴적인 영향으로부터 발생할 수 있다(3). 생체의 고분자 시험법은 단백질, 당단백질, 탄수화물, 지질 및 저분자량 성분의 혼합물로 구성된 고분자 시약을 포함하며 재수화되면(rehydrated) 투명한 각막의 고도로 배열된 구조를 모방하는 복잡한 고분자 매트릭스(macromolecular matrix)를 형성한다(5)(6). 안구 유해성을 나타내는 시험물질은 고분자 매트릭스 성분의 파괴 및 분해 뿐 아니라 단백질의 변성, 폴립(unfolding) 및 형태의 변화를 촉진하여 고분자 시약을 혼탁하게 만든다. 고분자 시험법 OI[®]는 원래 각막 혼탁을 초래하는 안자극 물질의 파괴적인 영향을 다루기 위해 개발되었지만 검증연구에서 해당 시험법이 토끼 안점막 자극시험(OECD TG405)에서 평가되는 것과 같이 결막 손상 만을 초래하는 자극물질도 감지할 수 있는 것으로 나타났다. 그러나 고분자 시험법은 무세포 생화학 시험계(test system) 이므로 안독성의 세포독성 및 가역성 측면은 다루지 않는다. 따라서 분류를 결정할 때에는 GD 263(2)에 설명된 기존 데이터와 지식에 기반하여 시험물질과 연관이 있을 것으로 생각되는 가능한 모든 안독성 기전에 대해 고려해야 한다.

5. OI[®] 시험법은 심한 안손상을 유발하는 물질(UN GHS Category 1)과 안자극 혹은 심한 안손상에 대한 분류가 필요하지 않은 물질(UN GHS No Category)을 식별하기 위해 최초로 검증된 고분자 시험법이다. 본 시험법은 검증된 참고시험법(Validated Reference Method, VRM)이다. Guidance Document No. 34(8)의 원칙에 따른 시험법평가 기준(Performance Standards)(7)은 OI[®] 시험법과 유사한 신규 또는 변경된 생체의 고분자 시험법의 검증을 용이하게 하고 이들 시험법을 추가하기 위해 본 시험 가이드라인을 적시에 수정할 수 있도록 한다. 화학물질 평가자료 상호인정(Mutual Acceptance of Data,

MAD)은 시험법평가기준(Performance Standards)에 따라 검증된 시험법에 대해서만 보증되며, 이러한 시험법이 OECD에 의해 검토되어 본 시험법 가이드라인에 포함된 경우에만 보장된다.

6. 본 시험 가이드라인에서 '시험물질(test chemical)' 용어는 시험 대상을 의미하며, 물질(substance) 및/혹은 혼합물(mixture) 시험에 대한 생체의 고분자 시험법의 적용 가능성과는 관련이 없다. 용어정의는 부록 1에 수록되어 있다.

초기 고려사항, 적용가능성 및 제한점

7. 생체의 고분자 시험법 OI[®]는 2009년에서 2012년 사이 독립적인 검증연구를 거친 후(9) 2016년에 EURL ECVAM 과학자문위원회(Scientific Advisory Committee, ESAC)의 독립적인 전문평가를 받았다(10). ESAC의 권고에 따라 시험법에 사용된 원재료인 고분자 매트릭스 분말의 화학적 정보 규명 및 시간에 따른 안정성 관련 보충 자료에 대한 추가 평가가 OECD 전문가 그룹에 의해 수행되었다. 검증연구 동안 총 89개의 시험물질(13개 혼합물, 76개 물질)이 평가되었다. 이 시험물질들은 다양한 작용기를 갖는 20개의 UN GHS Cat. 1, 26개의 UN GHS Cat. 2 및 43개의 UN GHS No Category 물질로 구성되어 있으며 고체 25개, 액체 57개 및 점성 물질 7개를 포함함으로써 넓은 범위를 커버하였다. 본 시험 가이드라인은 시험물질의 10% 수용액/분산액(v/v 혹은 w/v)의 pH 범위가 4 이상 9 이하($4 \leq \text{pH} \leq 9$)인 고체와 액체 물질에 적용 가능하다. 액체는 점성이거나 비점성일 수 있다. 고체는 계면활성제 특성을 가진 경우를 제외하고는 원물질(neat) 상태로 적용되므로 수용성이거나 비수용성일 수 있다. 가스와 에어로졸은 검증연구에서 아직 평가되지 않았으므로 적용범위에 포함되지 않는다.

8. 7항에서 정의된 적용범위 내에 포함하는 물질 중 일부 물질[(예: 진한 유색 물질, 염석 침전(salting-out precipitation)을 유발하는 물질, 고농도의 일부 계면활성제, 고휘발성 물질)]이 시험계를 방해할 수 있다는 특정 제한점이 이전 버전의 고분자 시험법 혹은 검증연구(11)의 실험실내 데이터(in-house data)로부터 확인되었다. 이러한 방해 작용에는 대조군 및 시험물질에 대한 특정 OD₄₀₅ 판독 값으로 반영되는 고분자 매트릭스의 적절한 기능 억제(22-23항), 또는 결과 보고서 및 분석의 필수부분으로 간주되는 시험 시스템의 특정 관찰(25항)이 포함될 수 있다. 인정 요건은 22~23항에 기술되어 있고 시스템 소프트웨어 내에 통합되어 있으며 이를 통해 위와 같은 제한점을 지속적으로 확인할 수 있다.

9. 본 시험 가이드라인은 단일 및 혼합물질에 적용가능하다. 혼합물, 시험하기 어려운 물질(예: 아크릴산염과 같이 불안정하고 중합성을 가진 물질) 혹은 본 가이드라인의 적용 범위 내에 명확히 포함되지 않는 물질 등의 시험을 고려할 때에는 이러한 결과가 과학적으로 유의미하거나 의도하는 규제 목적에 적합한 결과 산출가능 여부를 사전에 고려해야 한다. 또한 선택된 생체의 시험법이 제공하는 기전적 이해(mechanistic insight) 및 시험물질의 기전을 다루는 방법에 대해 고려하는 것이 중요하다. 적절한 경우, OECD GD263(2)에 기술된 것처럼 가능하다면 다른 작용기전을 기반으로 하는 추가 생체의 시험법의 사용을 고려해볼 수 있다.

10. 고분자 시험법의 수행능(performance)은 EURL ECVAM ESAC에서 권고(10)한 바와 같이 검증연구 동안 각 참여실험실에서 각각의 화학물질에 대한 적격화(qualified) 결과로부터 산출된 개별 예측값에 대해 가중치 계산법(weighted calculation)을 사용하여 평가되었다. 심한 안손상을 유발하는 화학물질(UN GHS Category 1) 식별에 사용되는 경우 다른 곳에 요약된 것처럼(2) 불확실성(uncertainties)을 가지는 UN GHS에 따라 분류된 생체내 토끼 안점막자극시험 데이터와 비교 시 생체의 고분자 시험법은 전반적으로 정확도 75%(66.5/89), 특이도 81% (55.8/69), 민감도 54%(10.7/20)를 나타내었다. 이러한 결과에는 기 채택된 다른 안자극 시험에서 음성 결과를 나타내는 것으로 확인된 불안정하고 빛에 민감한 중합성 시약인 Tetraethylene glycol diacrylate(UN GHS Cat. 1)의 음성 결과가 포함된다. 이러한 시험하기 어려운 물질을 수행능 분석에 포함하지 않는 경우 생체의 고분자 시험법은 전반적으로 정확도 76%(66.5/88), 특이도 81%(55.8/69), 민감도 56%(10.7/19), 위양성을 19%(13.1/69) 및 위음성을 44%(8.3/19)를 나타낸다. Cat. 1 물질 식별에 사용되는 경우 생체내에서 지속적이지만 심각하지 않은 영향만을 기준으로 분류된 시험물질은 과소예측(under-prediction)(7개 중 5개 물질)의 위험성이 더 높은 것으로 나타났다. 그러나 음성 결과를 나타내는 모든 시험물질은 추후 규제적 요구사항에 따라 OECD GD 263(2)의 가중치 접근법 내 순차적 시험 전략을 사용하는 다른 적합한 검증된 생체의 시험을 사용하거나 혹은 최후의 수단으로 토끼를 사용하여 시험되기 때문에 이 같은 맥락에서 위음성을[(예, 생체내에서 UN GHS Cat. 1로 분류된 물질이 이 시험에서 UN GHS Cat. 1로 분류되지 않는 경우)]이 치명적이지는 않다.

11. 안자극 및 심한 안손상에 대한 분류가 필요하지 않은 시험물질 확인에 사용되는 경우 다른 곳에 요약된 것처럼 불확실성(uncertainties)(2)을 가지는 UN GHS에 따라 분류된 생체내 토끼 안점막자극시험(1)(9) 데이터와 비교 시 생체의고분자 시험법은 가중치 접근법 기반 계산에서 전반적으로 정확도 75%(67.9/89), 민감도 91%(41.7/46), 특이도 59%(25.3/43)를 가지는 것으로 나타났다. 그러나 이와 같은 결과는 기 채택된 다른 안자

극 시험에서 음성 결과를 나타내는 것으로 확인된 불안정하고 빛에 민감한 중합성 시약인 Tetraethylene glycol diacrylate(UN GHS Cat. 1) (CAS 17831-71-9)를 포함한다. 이러한 시험하기 어려운 아크릴산염 포함 물질을 수행능 분석에서 고려하지 않는 경우 생체의 고분자 시험법은 UN GHS에 따라 분류된 생체내 토끼 안점막자극시험(1) (9)과 비교 시 전반적으로 정확도 76%(67.0/88), 특이도 59%(25.3/43), 민감도 93%(41.7/45), 위양성을 41%(17.7/43) 및 위음성을 7%(3.3/45)를 나타낸다. 그러나 양성 결과를 나타내는 모든 시험물질은 추후 규제적 요구사항에 따라 OECD GD 263(2)의 가중치 접근법 내 순차적 시험 전략을 사용하는 다른 적합한 검증된 생체의 시험을 사용하거나 혹은 최후의 수단으로 토끼를 사용하여 시험되기 때문에 이 같은 맥락에서 위양성율(즉, UN GHS No Cat. 물질이 분류가 필요한 것으로 확인 됨)이 치명적이지는 않다. 또한 GD 263(2)에서 기술된 IATA의 고려사항에 따라 아크릴산염 작용기를 포함하는 물질의 경우 이들 물질의 작용기가 피부 자극 위험(alert)과 관련성이 있어 상향식 접근방식의 시작을 위한 가설과 일치하지 않으므로 상향식 접근방식 시험의 후보물질이 되지 않을 것으로 예상된다는 점에 주목해야한다(OECD GD 263(2)의 그림2.1 내 part 2 참조).

12. 생체의 고분자 시험법에서 상당수의 *in vivo* UN GHS Cat. 1 물질이 UN GHS Cat 2, 2A 혹은 2B로 과소분류(underclassified) 되고 *in vivo* UN GHS No Cat. 물질이 UN GHS Cat. 2, 2A 혹은 2B로 과대분류(overclassified) 되므로 안자극을 유발하는 것으로 분류해야 하는 시험물질(UN GHS Cat. 2 혹은 2A) 혹은 약한 안자극을 유발하는 것으로 분류해야 하는 시험물질(UN GHS 2B)의 확인에는 권장되지 않는다. 이들 물질의 경우 IATA 지침서(2)에 따른 분류를 위해 추가 정보 혹은 다른 시험법을 이용한 추가 시험이 필요할 수 있다.

시험 원리

13. 생체의 고분자 시험법 OI[®]는 두 가지 요소로 구성되며 이는 고분자 매트릭스 및 시험물질을 고분자 매트릭스로 조절하여 전달(controlled delivery)하는데 사용되는 멤브레인 디스크(membrane disc)이다. 이는 미세포성 생화학적 시험 시스템으로 안독성의 세포독성 측면은 다루지 않는다. 고분자 매트릭스는 시험물질의 표적으로 작용하며 겔 매트릭스를 형성하는 단백질, 당단백질, 탄수화물, 지질 및 저분자량 성분의 혼합물로 구성된다. 매트릭스의 일부인 단백질 올리고머(oligomer)는 비공유력(non-covalent forces)에 의해 자가결합하여 더 큰 미세섬유(fibrils)를 형성한다. 고분자 매트릭스는 완충염용액으로 재수화(rehydrated) 되었을 때 고도로 정돈되고 투명한 구조를 형성한다. 안손상을 유발하는 시험물질은 콜라겐 변성과 지질의 비누화(알칼리에 의해 발생), 단백질의 응고와 침전(산

에 의해 발생) 및/또는 지질의 용해(용매에 의해 발생)(12)를 유발하는 것으로 알려져 있다. 단백질의 변성, 폴림(unfolding) 및 형태 변화를 초래하는 시험물질은 고도로 배열된 고분자 시약 매트릭스의 파괴와 분해를 유발하여 고분자 시약을 혼탁하게 만든다. 이러한 현상은 광산란의 변화를 측정(분광계를 사용하여 405 nm 파장에서 측정)하여 정량화되며, 이 값을 보정물질(calibrators) 한 세트의 OD값 증가 결과에 의해 작성되는 표준곡선과 비교하게 된다. 표준곡선은 시험물질의 각 시험용량/농도의 Irritation Draize Equivalent(IDE) 점수(자세한 설명은 19항 참조)를 구하기 위해 사용한다. 시험물질의 5개 시험용량/농도 중 가장 높은 IDE 점수를 Maximal Qualified Score(MQS)라고 하며, 사전에 정해진 기준값(cut-off values)(22항 참조)을 기반으로 UN GHS 안구 유해성 분류를 결정하는데 사용한다.

속련도 확인

14. 생체의 고분자 시험법을 확립하는 모든 실험실은 부록 3에 제시된 속련도 물질을 사용해야 한다. 실험실은 규제 유해성 분류 목적으로 생체의 고분자 시험법 결과를 제출하기 전 속련도 물질을 사용하여 기술적 역량을 증명해야 한다.

시험 방법

15. Ocular Irritation[®] 시험법은 현재 본 시험 가이드라인에 포함된 유일한 생체의 고분자 시험법이다. 본 시험법의 프로토콜은 이용 가능하며 실험실에서 이 시험법을 적용 및 사용하는 경우 해당 프로토콜을 사용해야 한다(11). 아래 항은 Ocular Irritation[®]의 프로토콜을 기반으로 한 생체의 고분자 시험법의 주요 요소와 절차를 기술하고 있다.

시험물질의 특성규명

16. 시험물질 10% 수용액(water solution)의 pH를 측정하여 시험법의 적용 가능 범위 내에 있는지 확인한다. 용해도가 다른 물질의 pH 측정을 위한 세부적인 절차는 시험 프로토콜에 기술되어 있다(11). 아울러 계면활성제 특성이 명확히 확인되지 않은 시험물질의 경우 18항에 설명된 적절한 시험물질 적용 절차를 결정하기 위해 프로토콜(11)에 기술된 바와 같은 거품형성시험(Foam Test)을 실시한다. 거품형성시험은 10% 시험물질 용액을 10초간 볼텍스 후 형성되는 거품층의 비율과 지속성을 평가한다(11).

시약 준비와 활성화

17. 생체의 고분자 시험법 OI[®]의 기본이 되는 고분자 매트릭스는 키트와 함께 제공되는 시약 분말(reagent powder)을 수화용액(hydrating solution)에 용해하고 용해된 시약을 여과하여 준비한다. 최종 pH와 온도는 사전에 확립된 범위 내에 들어야 한다(pH 범위 7.9-8.2 및 온도 범위 20-25°C). 아울러 시약 용액(reagent solution)(각 시험용량/농도에 대해 병행하여 사용하는 블랭킹 버퍼)의 pH를 낮추고 배열된 고분자 매트릭스의 형성을 개시하기 위해 액티베이터 완충 용액(activator buffered solution)을 사용하여 시약 용액을 활성화해야 한다. 활성화된 시약 용액의 최종 pH는 실온(20-25°C)에서 사전에 확립된 pH 범위 내에 들어야 한다(OI[®]의 경우 6.4-6.7). 활성화된 단백질 매트릭스 시약 용액의 분주량(aliquot)을 24-well 플레이트로 옮긴다.

시험물질의 적용

18. 시험물질은 물리화학적 특성(Annex 2a의 그림1 참조)에 따라 실온(20-25°C)에서 고분자 매트릭스에 직접 적용하거나 셀룰로스 막 위에 적용한다. 계면활성제가 아닌 고체 물질 혹은 16항 및 시험 프로토콜(11)에 기술된 거품형성시험 결과 계면활성제와 같은 특성이 없는 것으로 나타난 미지의 고체 시험물질의 경우, 5개의 연속 시험용량(25, 50, 75, 100 및 125 μ l(액체) 혹은 mg(고체)의 원물질(neat)을 매트릭스 시약 위에 놓인 멤브레인 디스크에 적용한다. 고체 물질의 경우 막의 표면 전체에 고르게 도포 되도록 하기 위해 분쇄하여 사용할 수 있다. 알려진 계면활성제 및 거품형성시험(11) 결과 계면활성제와 유사한 특성을 가지는 미지의 시험물질은 먼저 증류수를 이용하여 5 % working solution을 조제하고, 2배씩 희석한 5개 농도(0.3125%, 0.625%, 1.25%, 2.5% 및 5%)의 시험물질 125 μ l를 고분자 활성시약에 직접 적용한 다음 웰(well) 위에 멤브레인 디스크를 놓는다(부록 2a 참조). 밀랍성 고체(waxy solid)(조각) 시험물질의 경우 희석하지 않은 상태로 시약 용액에 직접 적용하고 멤브레인 디스크를 놓는다(부록 2a 참조).

19. OI[®] 시험법의 고분자 매트릭스는 배양기(25 \pm 1°C)에서 시험물질과 동시 대조군을 적용하여 24.0 \pm 0.5 시간 동안 노출시킨다. 노출 후 시험 시스템을 육안으로 확인한다. 비 계면활성제 시험물질(또는 거품형성시험(11) 결과 계면활성제와 유사한 특성을 가지지 않는 미지의 시험물질)의 경우 디스크 막이 손상되지 않고, 온전해야 한다. 또한 웰(well) 내 용액의 부피가 감소한 경우 흡습효과(hygroscopic effect)가 나타났거나 기술적인 문제일 수 있다. 이 경우 실험을 1회 반복하며, 동일한 현상이 관찰되는 경우 해당 시험물질을 제외하거나 시험법에 적합하지 않은 것으로 간주한다.

대조군 물질

20. 동시 대조군은 시험물질과 동시에 시험해야 한다. OI[®]의 경우, 동시 대조군은 키트에서 제공하는 보정물질(calibrating chemicals) 4종 및 품질관리물질(quality controls) 2종을 포함한다(부록 1 정의 참조). 보정물질은 UN GHS 분류에 따른 No Cat. 부터 Cat. 1까지의 4개의 물질을 포함하며 IDE 점수 판독(21항 및 Annex2b에 기술)을 위한 표준 곡선을 산출하는데 사용되는 정해진 OD값 반응 범위(표 1)를 아우른다. 2개의 품질관리물질은 예측모델 절사값(cut-offs)에 근접한 자극 가능성과 관련된 정해진 IDE 점수 범위를 가진다.

IDE 및 MQS 점수 판독

21. 배양이 끝나면 405nm에서 OD값 판독을 하기 위해 24-well 플레이트의 시험물질 및 대조군(20항 참조) 용액을 96-well 플레이트로 옮긴다. 물질을 옮기는 방법은 키트내 프로토콜에 상세히 기술되어 있다(11). 각 웰(well)의 미가공(raw) OD 판독값을 얻고, 품질관리물질 및 시험물질에 대한 IDE 점수는 Annex2b에 요약된 공식에 따라 소프트웨어로 계산된다. 시험물질의 MQS는 보정물질 및 품질관리물질에 대한 OD 점수 분석(22항 참조) 과 5개의 시험물질 용량/농도로 생성된 용량 반응의 측면(23항 참조)을 기반으로 적절성이 검증된 단회 시험으로 결정된다.

데이터 및 시험결과 기록

시험 인정 요건

22. VRM OI[®] 결과의 적격 여부는 아래의 적격성 검사(qualification check)를 자동으로 수행하는 소프트웨어에 의해 결정된다.

- 시험 수행(test run) 적격성 검사: 시험 수행(test run)이 추가 데이터(further data) 분석에 적격하다고(qualified) 받아들여지기 위해서는 4개의 보정물질과 2개의 품질관리물질과 관련된 두개의 기준 중 하나를 충족해야 한다.
 - 4개의 모든 보정물질과 2개의 품질관리 물질 중 최소 1개에서 얻은 값이 사전에 확립된 허용 범위 내에 있어야한다(표 1).
 - 4개의 보정물질 중 3개에서 얻은 값과 2개의 품질관리물질에서 얻은 값이 사전에 확

립된 허용 범위 내에 있어야한다(표 1). 1개의 보정물질만이 허용 범위를 벗어나는 경우 OI[®] 는 표준곡선 생성을 위해 사전에 정의된 값으로 이를 대체한다.

2개 이상의 보정물질이 범위에서 벗어나거나 1개의 보정물질과 1개의 품질관리물질이 각각 범위를 벗어나는 경우 OI[®] 시험 수행(test run)은 부적격(non-qualified)으로 간주된다.

표 1. OI[®] 시험법 보정물질 및 품질관리물질의 인정 요건

OD ₄₀₅ 허용 범위	
보정물질 0	0.062 ~ 0.262
보정물질 1	0.089 ~ 0.315
보정물질 2	0.351 ~ 0.945
보정물질 3	1.277 ~ 2.127
IDE 허용범위	
품질관리물질 1	7.2 ~ 20.8
품질관리물질 2	23.6 ~ 35.6

23. 시험물질에 대한 허용가능한 MQS가 결정(24항 참조)되기 전 아래 사항에 대한 추가 확인이 소프트웨어에 의해 수행되며 이를 통해 시험물질과 대조군에 대한 5개의 데이터 포인트의 추가 해석이 가능하다. 아래 확인사항을 고려하여 적격한(qualified) 시험 수행(test run)의 결과가 제외될 수 있다.

- Net Optical Density 확인: 시험물질에 대한 Net OD_x는 사전에 확립된 값보다 커야 한다(> -0.015). 시험물질의 최종 OD_x가 -0.015 미만(<)인 경우 선형외삽법(linear extrapolation)으로 유의미한 IDE 점수를 계산할 수 없으며 해당 시험결과는 MQS 결정 사항에서 제외된다.
- 적격한(qualified) 수행(run)에서 시험물질에 대한 최종 OD_x가 OD_{Cal2} 미만인 경우 고분자 매트릭스가 제대로 반응하는지 확인하기 위해 추가 검사가 요구된다. 이 같은 검사는 시험 키트에 제공되는 억제 확인 용액(inhibition check solution)을 추가한 뒤 OD_x를 재측정하여 수행된다. 이때 OD_x가 추가 해석에 적격한(qualified) (혹은 허용되는)데이터로 인정되기 위해서는 OD_{Cal2} 이상이어야 한다.
- Blank OD 값 확인: 각 시험물질의 용량/농도에 해당하는 Blank OD 값이 1.2를 초과하는 경우 시험물질로 인한 간섭을 나타낸다(진한 색상). 해당하는 blank 대조군이 있는 시험물질은 색간섭 및 제외된 시험결과 상태를 확인하기 위해 최소 한번 재시험할 수 있다.
- 마지막으로 시험물질의 용량반응이 알려진 종류의 올바르게 예측되는 물질의 전형적인 패턴 특징과 일치하는지 확인하기 위해 용량반응 검사를 수행한다. 시험물질의 용

량반응 관계가 비전형적/불규칙한 패턴을 가지는 경우 IDE 결과는 MQS 결정을 위한 고려사항에서 제외되어야 한다. 적절한 적격용량반응 곡선의 예시는 키트와 함께 제공되는 프로토콜에 제시되어 있다(8).

결과 해석 및 예측 모델

24. 적격한(qualified) 시험물질로 얻은 광학밀도(OD₄₀₅)를 각 시험 용량/농도에 대해 보정물질 세트에서 얻은 표준 곡선과 비교하여 IDE 점수를 산출한다. 획득한 가장 높은 IDE 점수인 MQS(Maximal Quality Score)는 UN GHS 분류 체계(1)에 따른 시험물질의 안구 유해성 가능성을 예측하는데 사용된다. 생체외 고분자 시험법 OI[®]의 경우 표 2의 예측 모델이 사용된다.

표 2. OI[®] 예측 모델

MQS	예측된 UN GHS 분류**
0 ~ 12.5	No Category
> 12.5 ~ 30.0	No prediction can be made*
> 30.0	Category 1

* MQS 결과가 12.5 보다 크고 30.0 이하인 경우 이 결과로부터 별개로 최종 예측이 이루어질 수 없다(No final Prediction Can be made, NPCM). 그 이유는 상당한 수의 *in vivo* UN GHS Category 1 물질이 이 간격내에서 MQS를 나타내고 이에 따라 고분자 시험법에서 과소예측 되었기 때문이다. 또한 상당수의 *in vivo* UN GHS No Cat. 물질이 이 간격내에서 MQS를 나타내었다(즉, 과대 예측이 이루어짐). 12.5 보다 크고 30.0 이하인 간격에서 MQS를 나타내는 물질의 최종 분류에는 IATA 지침서에 따른 다른 시험법을 사용한 추가 정보 및(혹은) 시험이 필요하다.

** 시험물질을 분류할 때에는 GD263에 서술된 바와 같이 기존 정보와 지식을 기반으로 시험물질과 관련된 모든 안독성 기전에 대해 고려해보아야 한다.

시험 보고서

25. 시험 보고서는 시험의 수행과 관련하여 아래의 정보를 포함해야 한다.

시험물질 및 대조군 물질

- IUPAC, CAS 명, CAS 등록번호, SMILES 혹은 InChI 코드, 구조적 공식 및(혹은) 기타 식별자 등의 화학물질 식별 정보
- 시험/대조군 물질 혹은 혼합물(무게에 따른 퍼센트로 표기)의 순도 및 구성(가능한

범위내에서 전부)

- 다성분 시험물질 UVCB의 경우, 가능한 모든 특성평가 정보(예: 화학물질 식별정보(위의 내용 참조), 순도, 성분의 정량적 형태 및 관련 물리화학적 속성(위의 내용 참조))
 - 물리적 상태, 휘발성, pH, 안정성, 화학물질 등급, 시험의 수행과 관련한 수용해도(water solubility), 색상, 광학밀도 혹은 흡광도 특성과 같은 물리화학적 특성
 - 프로토콜(11)에 기술된 바에 따라 결정된 시험물질 10% 용액의 pH
 - 시험물질의 계면활성제 특성이 공급자에 의해 정의되지 않은 경우, 거품형성시험의 결과
 - 필요한 경우 시험 전 시험/대조군 물질의 처리(예: 가온, 분쇄)
 - 가능한 자세한 보관 조건 및 안정성
- 해당되는 경우 용매(solvent) 혹은 부형제(vehicle)

시험의뢰자 및 시험기관과 관련한 정보

- 시험법 의뢰자, 시험 시설 및 연구 책임자의 이름 및 주소

시험법 조건

- 사용된 시험계의 설명
- 시간 경과에 따른 시험법의 수행능(정확도 및 신뢰도) 확인에 사용되는 절차(예: 숙련도 물질의 주기적 시험)

시험 절차

- 사용된 시험 용량/농도의 수
- 해당되는 경우, 용매 및 기준(benchmark) 대조군의 식별정보
- 사용된 물질 용량, 적용 및 노출 시간
- 해당되는 경우, 시험 절차 변경에 대한 설명

결과

- 시험 수행(test run)의 인정 요건에 대한 결과를 포함한 보정물질과 품질관리물질의 OD₄₀₅ 표: 적격(qualified) 혹은 부적격(not-qualified) 분석
- 각각의 시험물질용량에 대한 OD₄₀₅, Net OD₄₀₅ 및 IDE 점수의 표
- 시험물질에 대한 적용가능 기준 확인 결과: 제외된 결과 혹은 재시험을 위한 프롬프트(prompt)/플래그(flag) 문구
- 해당되는 경우, 재시험 결과
- 시험 절차의 끝에 관찰된 기타 효과에 대한 설명(예: 막의 온전함, 증발을 나타내는

플레이트 뚜껑 위 물방울, 용량 감소, 착색)

- Maximal Qualified Score(MQS) 및 해당 점수에서 예측되는 *in vitro* UN GHS Category

결과의 논의

결론

참고문헌

1. United nations (UN) (2017). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Seventh revised edition, UN New York and Geneva, 2017. Available at: https://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev07/English/03e_part3
2. OECD (2018). Guidance Document on an Integrated Approach on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye Irritation. Series on Testing and Assessment, No. 263. Environment, Health and Safety Publications, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France. Available at: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2017\)15&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2017)15&doclanguage=en)
3. Scott L, Eskes C, Hoffman S, Adriaens E, Alepee N, Bufo M, Clothier R, Facchini D, Faller C, Guest R, Hamernik K, Harbell J, Hartung T, Kamp H, Le Varlet B, Meloni M, Mcnamee P, Osborn R, Pape W, Pfannenbecker U, Prinsen M, Seaman C, Spielmann H, Stokes W, Trouba K, Vassallo M, Van den Berghe C, Van Goethem F, Vinardell P, Zuang V (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace in vivo Studies Using Bottom-up and Top-down Approaches. *Toxicology In Vitro* 24, 1-9.
4. Barroso J., Pfannenbecker U., Adriaens E., Alépée N., Cluzel M., De Smedt A., Hibatallah J., Klaric M., Mewes K.R., Millet M., Templier M., McNamee P. (2017). Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation in vivo data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). *Archives of Toxicology* 91, 521-547.
5. Gordon V (1992). The scientific basis of the EYTEX™ system. *ATLA* 20, 537-540
6. Kelly C (1989). EYTEX An in vitro method of predicting ocular toxicity. *Pharmacopeial forum*, p 4815
7. OECD (2019). Series on Testing and Assessment No. 312: Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified In Vitro Macromolecular Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage.
8. OECD (2005). OECD Series on Testing and Assessment No. 34. Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated

Test Methods for Hazard Assessment. Available at:
<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.

9. Eskes C, Hoffmann S, Facchini D, Ulmer R, Wang A, Flego M, Vassallo M, Bufo M, van Vliet E, d'Abrosca F, Wilt N (2014). Validation Study on the Ocular Irritection[®] Assay for Eye Irritation Testing. *Toxicology In Vitro* 28, 1046-1065.
10. ESAC (2016). EURL ECVAM Scientific Advisory Committee Opinion on the Ocular Irritection[®] test method for prediction of serious eye damage/ eye irritation potential of chemicals. ESAC Opinion No. 2016-01 of 24 June 2016; EUR 28174 EN; doi:10.2787/991443. Available at:
<http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103703>.
11. DB-ALM (INVITTOX) (2013). Protocol 157: Ocular Irritection[®] Assay System, 25pp. Available: <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu>.
12. Eskes C. (2010). Guidance Document on the Application of Alternative methods in the Regulatory Assessment of Chemical Safety Related to Human Eye Irritation and Severe Irritation: Current Status and Future Prospects. FOPH, 65 pp. Available at:
<http://www.bag.admin.ch/themen/chemikalien/00253/03225/12694/index.html?lang=fr>
13. OECD (2017). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France. Available at:
http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects_20745788.

부록 1

용어 정의

정확도(Accuracy) : 시험결과와 참고치의 일치 정도. 시험 수행에 대한 평가 척도이고 “상관성(relevance)”의 한 측면이다. 정확도는 정확하게 맞춘 시험결과의 비율을 의미하는 “일치성(concordance)”와 같은 의미로 종종 쓰임

액티베이터(Activator) : 단백질이 수화(hydrated)될 때 배열된 고분자 매트릭스 (macromolecular matrix)의 형성을 시작하기 위해 사용되는 용액

기준(Benchmark) 물질 : 시험물질과의 비교를 위한 기준으로 사용되는 화학물질로 다음의 특성을 지녀야 한다. i) 지속적이고 믿을만한 출처, ii) 시험에 사용되는 물질 등급과의 구조적 및 기능적 유사성, iii) 알려진 물리/화학적 특성, iv) 알려진 효과를 뒷받침하는 데이터, v) 원하는 반응 범위 내에서 알려진 역가(potency)

블랭킹 버퍼(Blanking buffer) : 시험계에서 시험물질이 OD₄₀₅ 판독값에 끼치는 배경 기여(background contribution)을 설명하기 위해 사용되는 대조 용액

상향식 접근방식(Bottom-Up approach) : 안자극 또는 심한 안손상에 대한 분류가 필요하지 않은 것으로 추정되는 시험물질에 사용되는 단계적 접근법. 양성의 결과가 나오는 다른 화학물질로부터 음성의 결과가 나오는 분류 및 표시가 필요하지 않은 화학물질을 구별하는 것으로 시작함

보정물질(calibrators) : OI[®] 시험법에서 잘 특성화된 IDE 점수를 가지는 4개의 정의된 자극 용액(Cal 0, 1, 2와 3). 보정물질(calibrators)은 시험법의 결과 비교를 위한 표준곡선을 도출하고 최적의 수행능을 확인하는데 됨

각막: 홍채와 각막을 덮고 내부로 빛을 받아들이는 안구의 앞쪽 투명한 부분

안자극(Eye Irritation) : 물질이나 혼합물질 적용 후 나타나는 눈의 변화로 완전히 회복될 수 있는 것을 의미함. “눈에 발생하는 가역적인 영향” 및 “UN GHS Category 2”와 혼용가능함

위음성율(False negative rate) : 시험법에 의해 음성물질로 잘못 판정되는 양성물질의 비율이며, 시험법 수행 지표 중 하나임

위양성율(False positive rate) : 시험법에 의해 양성물질로 잘못 판정되는 모든 음성물질의 비율이며, 시험법 수행 지표 중 하나임

거품형성시험(Foam test) : 알려지지 않은 물질이 계면활성제 적용 절차 혹은 비계면활성제 적용 절차 중 어떤 것으로 실험 되어야 하는지 결정하는데 사용됨 (11)

유해성(Hazard) : 생체, 생태계 또는 특정 집단이 화학물질에 노출될 때, 유해한 영향을 야기할 가능성이 있는 물질 또는 환경(situation)의 본질적 특성

수화(Hydrating) 용액 : 시약 분말(reagent powder)을 수화(hydrated)하거나 배열된 단백질 매트릭스의 형성을 촉진하기 위해 사용되는 용액

통합독성평가(IATA, Integrated Approach to Testing and Assessment) : 화학물질 또는 화학물질 그룹의 유해성 확인(잠재력), 유해성 결정(효력) 및/또는 안전성 평가(잠재력/효력, 노출)를 위하여 사용되는 구조적 접근 방법. 잠재적인 유해성 및/또는 위험성 및/또는 심화 추적 필요성에 관한 규제결정을 위하여 모든 관련 데이터를 전략적으로 통합하고 경중을 가림으로써 최소한의 시험만 수행하도록 함

억제확인 용액(Inhibition check solution) : 고분자 시약과 빠르게 반응하여 분명한 혼탁함을 생성하는 것으로 알려진 자극성 물질로 적격(qualified) 시험 물질 용량/농도의 OD 판독값이 보정물질(calibrators) 2(Cal 2)보다 낮은 경우 고분자 시약의 기능을 검증하는데 사용될 수 있다. 억제 확인 용액을 적용하여 해당 well의 고분자 시약이 분명한 혼탁함을 생성할 수 있다는 것을 입증하고(즉, > OD 보정물질(calibrators) 2) 혼탁함이 OD 보정물질(calibrators) 2(Cal 2)보다 낮은 경우 부정확한 낮은OD(혹은 부정확한 비자극 물질) 결과를 식별함

눈에 대한 비가역적인 영향 : “심한 안자극” 및 “UN GHS Category 1” 참조

Irritation Draize Equivalent(IDE) 점수 : 보정물질(calibrators)로 얻은 곡선과 비교했을 때 시험된 용량/농도에 대한 OI[®] 시험법의 OD 측정값으로 산출한 점수

Maximal Qualified Score (MQS) : 시험물질을 다른 용량/농도에서 시험했을 얻은 최고 IDE 점수를 나타내며 0에서 51까지의 범위는 시험물질의 잠재적인 자극 가능성을 예측하는데 사용됨

Membrane Disc : 단백질 시약에 시험물질을 제어 전달(controlled delivery)하는 것을

뚫는 반투과성(semi-permeable) 막

혼합물(Mixture) : 서로 반응하지 않는 두 가지 이상의 물질로 구성된 혼합물질 또는 용액

Net 광학밀도(Net Optical Density) 확인 : 활성화된 단백질 시약의 OD를 측정하고 활성화된 blanking buffer의 OD를 뺀으로써 Net 광학밀도의 측정값을 제공한다. Net OD값($OD_{\text{reagent}} - OD_{\text{blank}} = OD_{\text{Net}}$)은 - 0.015 미만(>)이어야 함

분류 안됨(Not Classified) : 안자극(UN GHS Category 2) 혹은 심한 안손상(UN GHS Category 1)으로 분류되지 않는 시험물질. “UN GHS No Category”와 혼용하여 사용함

품질관리물질(quality controls) : OI[®] 시험법의 하위(7.2-20.8) 및 중/상위(23.6-35.6) 범위에 놓인 잘 특성화된 IDE 점수를 가진 두개의 정의된 자극 용액(QC1 and QC2). Quality control 검사는 시험법이 제대로 작동하는지 확인하고 하위 및 중/상위 IDE 범위에서 안자극 역가(potency)를 올바르게 탐지할 수 있음을 확인함

시약분말 : 단백질, 당단백질, 탄수화물, 지질 및 저분자량 성분의 혼합물로 구성. 시약 분말이 수화되면(hydrated) 배열된 고분자 매트릭스(macromolecular matrix)를 포함하는 용액을 형성한다. 이 용액 내 단백질은 자극성 시험에서 시험물질에 노출되었을 때 형태가 변경됨

신뢰도(Reliability) : 동일한 시험방법에 따라 반복시행 하였을 때 동일 실험실과 다른 실험실에서 시험 결과를 재현할 수 있는 정도. 신뢰도는 실험실 내, 실험실 간 재현성(reproducibility)과 실험실 내 반복성(repeatability)으로 평가됨

눈에 미치는 가역적 영향 : “안자극” 및 “UN GHS Category 2” 참조

민감도(Sensitivity) : 시험법이 양성/활성 시험물질을 정확하게 분류하는 비율. 시험물질의 분류를 결정하는 시험법에 대한 정확성의 척도이며 시험법의 상관성을 평가하는데 중요한 고려사항임

심한 안손상(Serious eye damage) : 눈에 물질이나 혼합물을 처리한 후 나타나는 완전히 회복되지 않는 안 조직 손상 또는 심각한 물리적 시력 감퇴. “눈에 발생하는 비가역적인 영향” 및 “UN GHS Category 1”과 혼용하여 사용할 수 있음

용매/부형제대조군(Solvent/vehicle control) : 용매나 부형제 등 시험계의 모든 요소를 포함하는 처리되지 않은 샘플. 물질로 처리된 샘플 및 다른 대조군 샘플과 함께 실험되며 동일한 용매나 부형제로 녹인 시험물질로 처리한 샘플의 기본반응(baseline response)을 정하기 위해 사용된다. 음성대조군과 함께 시험될 때, 용매/부형제 대조군 샘플은 용매나 부형제가 시험계와 상호작용을 하는지 보여줌

특이도(Specificity) : 시험법이 음성/비활성 시험물질을 정확하게 분류하는 비율. 시험법의 범주 결정에 대한 정확성의 척도이며 시험법의 상관성을 평가하는데 중요한 고려사항임

물질(Substance) : 생산과정을 통해 얻어지거나 또는 자연상태로 얻는 화학 원소들(elements)과 이들로 이루어진 구성물질(compound). 생산품의 안정성을 유지시키는데 필요한 모든 첨가제와 생산과정에서 유래하는 불순물을 포함하지만 해당물질의 안정성이나 그 조성의 변화에 영향을 주지 않고 분리될 수 있는 용매는 제외시킴

계면활성제 : 표면활성물질(surface-active agent)로도 불리는 계면활성제는 하나 이상의 친수 및 소수성 그룹으로 구성되는 물질 혹은 적절한 용매에 용해한 희석액으로 i) 액체의 표면장력을 줄이거나, ii) 액체-기체 계면에 확산 혹은 흡수 단분자층을 형성하거나 iii) 에멀전 및(혹은) 마이크로에멀전 및(혹은) 미셀(micelle)을 형성하거나, iv) 액체-고체 계면에서 흡수가 가능함

하향식 접근방식(Top-Down approach) : 심한 안손상을 유발할 것으로 추정되는 화학물질에 대한 단계적 접근법. 심한 안손상을 유발하는 양성(양성 반응)의 결과가 나오는 화학물질을 다른 화학물질(음성 반응)로부터 구별하는 것으로 시작됨

시험물질 : 시험법으로 평가되는 화학물질(물질 혹은 혼합물)

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 검토함. 예를 들어, 만약 어떤 시험물질의 자극 가능성을 기존 자료를 근거로 평가할 수 있다면, 추가적인 시험을 할 필요는 없음. 하지만 어떤 시험물질의 자극 가능성을 기존 자료를 근거로 평가할 수 없다면, 명백하게 분류를 할 수 있게 되기 전까지는 순차적인 단계의 동물실험이 수행되어야 함

UN의 화학물질의 분류 및 표시에 관한 국제조화시스템 [United Nations Globally

Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, (UN GHS)] : 물리적, 보건적, 환경적 유해성의 수준 및 표준화된 유형에 따른 화학물질(화합물 또는 혼합물)의 분류 체계로, 그림문자, 표시방법, 유해 사항, 사전 주의 사항, 안전정보지와 등의 소통 방식을 통해 화학물질의 유해 정보를 전달하여 사람(고용주, 근로자, 운송자, 소비자, 응급처치자 등)과 환경을 보호하고자 제시된 체계 (1)

UN GHS Category 1 : 심한 안손상/회복되지 않음

UN GHS Category 2 : 안자극/다시 회복 가능함

UN No Category : UN GHS Category 1 혹은 2 (2A or 2B) 분류를 위한 요구조건을 충족하지 않는 시험물질. “분류안됨(Not Classified)”와 혼용 가능

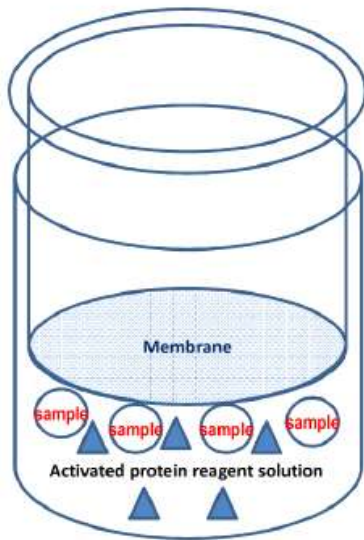
Validated Reference Method(s) (VRM(s)) : 하나 이상의 시험법으로 이와 관련된 공식 시험 가이드라인과 유사시험법평가기준(Performance Standard, PS) 개발에 사용된다. VRM은 PS 기반 검증연구의 틀에서 새로 제안된 유사 혹은 변형된 시험법을 비교하기 위한 참조 시험법으로 간주됨

증거의 가중치: 화학물질의 유해 가능성과 관련한 결론을 내리거나 이를 보충하기 위해 다양한 정보의 장점과 단점을 고려하는 과정

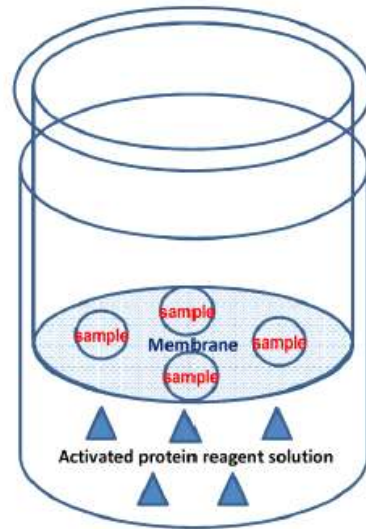
증거의 가중치 : 화학물질의 유해 가능성과 관련한 결론을 내리거나 이를 보충하기 위해 다양한 정보의 장점과 단점을 고려하는 과정

부록 2a

18항 관련 그림
시험 물질의 적용



계면활성제 및 비계면활성제
밀랍형 고체



비계면활성제(밀랍형 고체 제외)

부록 2b

소프트웨어에 의해 결정된 IDE 점수의 세부사항(21항과 비교)

배양이 끝나면 시험물질과 대조군의 raw OD₄₀₅ 판독값이 분광광도계로 수집되며(21항 참조) 아래의 공식을 이용하여 통합 소프트웨어에 의해 IDE 점수가 계산된다.

방정식 1: OD_{QC1,2} 혹은 Net OD_x < OD_{cal 1} 의 경우

$$IDE = (OD_{QC1,2} \text{ 혹은 Net } OD_x / OD_{cal 1}) \times 12.5$$

방정식 2: OD_{cal 1} < OD_{QC1,2} or Net OD_x < OD_{cal 2} 의 경우

$$IDE = [(OD_{QC1,2} \text{ 혹은 Net } OD_x - OD_{cal 1}) / (OD_{cal 2} - OD_{cal 1})] \times 17.5 + 12.5$$

방정식 3: OD_{cal 2} < OD_{QC1,2} 혹은 Net OD_x < OD_{cal 3} 의 경우

$$IDE = [(OD_{QC1,2} \text{ 혹은 Net } OD_x - OD_{cal 2}) / (OD_{cal 3} - OD_{cal 2})] \times 21.0 + 30$$

시험물질의 Net OD_x > OD_{cal 3} 의 경우 IDE 점수는 더 큰 보정값이 없기 때문에 선형외삽법으로 계산 할 수 없다.

시험물질의 Net OD_x = 시약 OD_x - Blanking buffer OD_x 는 시험물질로부터 잠재적인 배경 판독값을 확인하며 다음의 경우에 적용된다.

x는 시험물질의 용량 혹은 농도이다.

시약 OD는 시약 용액을 함유한 웰(well)의 시험물질 판독값을 대표한다.

Blank OD는 blanking buffer에서 시험물질을 함유한 웰(well)의 판독값을 대표한다.

OD_{QC1,2} 및 OD_{cal0, 1,2}는 시약용액을 함유한 웰(well)의 보정물질과 품질관리물질의 OD 판독값을 대표한다. 이러한 대조군물질은 405 nm에서 배경 판독값에 기여하지 않는 것으로 알려져 있다.

부록 3

생체의 고분자 시험법의 숙련도 물질

본 시험가이드라인 내 시험법을 일상적으로 사용하기에 앞서 실험실들은 표1에 제안된 12개 물질의 안구 유해성 분류를 올바르게 확인함으로써 기술적 숙련도를 증명해야 한다. 제시된 생체의 고분자 시험법 OI[®] 결과는 검증연구 동안에 관찰된 결과의 예시를 보여준다(9). OECD GD 34에서 권고하는 바와 같이 선별된 물질은 가능한 한 다음의 시험물질을 포함한다. (i) UN GHS 분류 체계에 기반한 생체내 심한 안손상/안자극 반응의 전체범위를 포함하는 물질(카테고리 1, 2A, 2B 혹은 No Category); (ii) 생체내 토끼 안점막 자극시험(OECD TG 405)의 참조에서 얻은 quality 결과에 기반한 물질(4)(11); (iii) 다른 물리적 상태를 포함하는 물질; (iv) 검증연구에 사용된 물질을 대표하는 폭넓은 물질 등급과 유기 작용 그룹을 포함하는 물질(9); (v) 고품질 OI[®] 데이터에 기반한 생체의 반응 범위를 포함하는 물질; (MQS 0-51) (vi) VRM에서 올바르게 재현 가능한 예측을 산출하는 물질; (vii) 상업적으로 이용가능한 물질; (viii) 불법적인 취득 및/혹은 폐기 비용과 연관이 없는 물질. 목록되어 있는 물질이 이용가능하지 않거나 기타 합당한 이유로 사용할 수 없는 경우 위에 설명한 기준을 충족하는 물질[예: 생체의 고분자 시험법 OI[®]의 검증에 사용된 물질 혹은 Performance Standard(OECD, 2019) 내에 참조물질로 리스트된 물질]이 사용될 수 있다(7)(9). 그러나 이 같은 변경은 정당화되어야 한다.

표 1: 생체의 고분자 시험법 OI®의 기술적 숙련도 증명을 위해 권장되는 물질

Chemical name	CASRN	<i>In vivo</i> UN GHS	Physical state	pH ^A	MQS range/n= runs Average (SD)	VRM Prediction (7)
2-methylresorcinol	608-25-3	Cat. 1	고체	5.8	>51/ n=9 n.a (n.a)	Cat. 1
4-tert-butylcatechol	98-29-3	Cat. 1	고체	5.5	>51/ n=9 n.a. (n.a)	Cat. 1
Benzalkonium chloride (5%)	63449-41-2	Cat. 1	액체	6.5	49.5/ n=1 n.a. (n.a)	Cat. 1 ^B
Promethazine hydrochloride	58-33-3	Cat. 1	고체	4.5	>51/ n=9 n.a. (n.a)	Cat. 1
Ammonium nitrate	6484-52-2	Cat. 2A	고체	4.8	14.1-27.3/ n=12 20.2 (3.0)	NPCM
Cetylpyridinium bromide (1%)	140-72-7	Cat. 2A	액체	4.7	15/ n=1 n.a. (n.a)	NPCM ^B
Methyl acetate	79-20-9	Cat. 2A	액체	6.8	15.0-21.1/ n=12 18.6 (1.5)	NPCM
Sodium benzoate	532-32-1	Cat. 2A	고체	8.2	7.4-20/ n=9 15.4 (2.5)	NPCM
1,5-dibromopentane	111-24-0	No Cat.	액체	5.7	6.7-10.3/ n=9 8.6(1.0)	No Cat.
Cetyl pyridinium bromide (0.1%)	140-72-7	No Cat.	액체	7.1	4-12.5/ n=10 6.8 (1.5)	No Cat.
Myristyl myristate	3234-85-3	No Cat.	고체	6.3	2.7-6.5/ n=9 4.6 (1.3)	No Cat.
Potassium tetrafluoroborate	14075-53-7	No Cat.	고체	4.5	6.8-19.2/ n=11 9.9 (2.1)	No Cat.

약어: CASRN=Chemical Abstracts Service Registry Number Cat.: category; n.a.: not available; NPCM: No Prediction Can be Made; UN GHS = United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (1).

A pH값은 소수점 한자리까지 반올림 되었으며 (11)에 나타나듯이 원출처(original source)에서 얻은 값이다.
B 실험실 내/간 재현성에 대한 데이터가 제한적이지만 관련성 있는 물질 및/혹은 결과를 대표함으로써 포함된 물질

OECD/OCDE

496

Adopted:
24 October 2019

OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS

In vitro Macromolecular Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage

INTRODUCTION

1. The *in vitro* macromolecular test method Ocular Irritation (OI[®]) is a biochemical *in vitro* test method that can be used to identify chemicals (substances and mixtures) that have the potential to induce serious eye damage as well as chemicals not requiring classification for eye irritation or serious eye damage.
2. It is currently generally accepted that, in the foreseeable future, no single *in vitro* eye irritation test will be able to fully replace the *in vivo* Draize eye test to predict across the full range of mechanistic aspects of irritation for different chemical classes. However, strategic combinations of alternative test methods within a (tiered) testing strategy that combine the strengths of individual *in vitro* test methods to address the required ranges of irritation potential and/or chemical classes with existing knowledge on mechanistic aspects of ocular toxicity within an Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA), may be able to replace the Draize eye test (2)(3) for hazard classification as defined by the United Nations (UN) Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) (1). The Top-Down testing strategy approach is designed to be used when, based on existing information, a chemical is expected to have high irritancy potential, while the Bottom-Up approach is designed to be used when, based on existing information, a chemical is expected not to cause sufficient eye irritation to require a classification (2)(3).
3. The *in vitro* macromolecular test method is an *in vitro* test method that can be used, under certain circumstances and with specific limitations as described in paragraphs 7 to 12, for eye hazard classification and labelling of chemicals. While it is not considered valid as a stand-alone replacement for the *in vivo* rabbit eye test, the *in vitro* macromolecular test method is recommended as an initial step of a Top-Down testing strategy approach as described within the OECD Guidance Document (GD) 263 (2) to positively identify chemicals inducing serious eye damage, i.e., chemicals to be classified as UN GHS Category 1 (1) without further testing. The *in vitro*

© OECD, (2019)

You are free to use this material subject to the terms and conditions available at <http://www.oecd.org/termsandconditions/>.

macromolecular test method is also recommended to identify chemicals that do not require classification for eye irritation or serious eye damage as defined by the UN GHS (UN GHS No Category) (1), and may therefore be used as an initial step within a Bottom-Up testing strategy approach (OECD GD 263) (2). However, a chemical that is neither predicted to cause serious eye damage (UN GHS Cat. 1) nor as UN GHS No Cat. (i.e. predicted not to cause eye irritation/serious eye damage) with the *in vitro* macromolecular test method would require additional information and/or testing to establish a definitive UN GHS classification. The choice of the most appropriate test method(s) and use of this Test Guideline should be seen in the context of the OECD GD 263 where the Top-Down and the Bottom-Up testing approach represent one part of a wider Integrated Approach on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation (2).

4. The purpose of this Test Guideline is to describe the procedures used to evaluate the eye hazard potential of a test chemical using the *in vitro* macromolecular test method. Corneal opacity is described as the most important driver for classification of eye hazard (4). It can result from the disruptive effects test chemicals may have on the highly organized structure of corneal proteins and carbohydrates through e.g. 'coagulation' described as the precipitation/denaturation of macromolecules (particularly proteins) or 'saponification' described as the breakdown of lipids (3). The *in vitro* macromolecular test method contains a macromolecular reagent composed of a mixture of proteins, glycoproteins, carbohydrates, lipids and low molecular weight components, that when rehydrated forms a complex macromolecular matrix which mimics the highly ordered structure of the transparent cornea (5, 6). Test chemicals presenting an ocular hazard will produce turbidity of the macromolecular reagent by promoting protein denaturation, unfolding and changes in conformation as well as disruption and disaggregation of the macromolecular matrix components. Although the macromolecular OI[®] test method was originally developed to address the disruptive effects of ocular irritants causing corneal opacity, the validation study suggests that it can also detect irritants that cause only conjunctival injuries as evaluated in the rabbit ocular irritancy test method (OECD TG 405). However, being an acellular biochemical test system, the macromolecular assay does not address the cytotoxicity and reversibility aspects of ocular toxicity. Therefore, consideration would need to be given to all possible mechanisms of ocular toxicity that may be relevant to the test chemical, based on existing data and knowledge as outlined in GD263 (2) when deciding on classification.

5. The Ocular Irritation[®] assay is the first validated macromolecular test assay to identify chemicals inducing serious eye damage (i.e., UN GHS Category 1) and chemicals that do not require classification for eye irritation or serious eye damage as defined by the UN GHS (UN GHS No Category). It is referred to as the Validated Reference Method (VRM) assay. Performance Standards (7) are available to facilitate the validation of new or modified *in vitro* macromolecular test methods similar to Ocular Irritation[®], in accordance with the principles of Guidance Document No. 34 (8), and allow for timely amendment of this Test Guideline for their inclusion. Mutual Acceptance of Data (MAD) will only be guaranteed for test methods validated according to the Performance Standards, if these test methods have been reviewed and included in this Test Guideline by the OECD.

6. The term "test chemical" is used in this Test Guideline to refer to what is tested and is not related to the applicability of the *in vitro* macromolecular test method to the testing of substances and/or mixtures. Definitions are provided in Annex 1.

INITIAL CONSIDERATIONS, APPLICABILITY AND LIMITATIONS

7. The *in vitro* macromolecular test method Ocular Irritation* underwent an independent validation study between 2009 and 2012 (9), followed by an independent peer-review by EURL-ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) in 2016 (10). Additional assessment of supplemental data as recommended by ESAC, regarding the characterisation of the raw material, the macromolecular matrix powder used to perform the assay and its stability over time, was conducted by the OECD expert group. A total of 89 test chemicals, including 13 mixtures and 76 substances, were assessed during the validation study. They covered a broad spectrum of functional groups distributed as 20 UN GHS Cat. 1, 26 UN GHS Cat. 2 and 43 UN GHS No Category test chemicals and including 25 solids, 57 liquids and 7 viscous test chemicals. The Test Guideline is applicable to solid and liquid chemicals whose 10% solution/dispersion (v/v or w/v as appropriate) has a pH in the range $4 \leq \text{pH} \leq 9$. The liquids may be viscous or non-viscous. Solids may be soluble or insoluble in water, as they are tested neat unless they have surfactant properties. Gases and aerosols have not been assessed yet in a validation study and are therefore outside of the applicability domain.

8. Specific limitations have been identified from in-house data with earlier versions of the macromolecular test assay or validation study (11) for some chemicals that fall within the applicability domain as defined within paragraph 7 (e.g. intensely coloured chemicals, chemicals which caused salting-out precipitation, high concentrations of some surfactants, and highly volatile chemicals), that may interfere with the test system. Interference may include inhibition of the proper functioning of the macromolecular matrix reflected as specific OD₄₀₅ readings for sets of controls and test chemicals (paragraphs 22-23), or specific observations of the test system considered as an integral part of the result report and analysis (paragraph 25). The set of acceptance criteria outlined in paragraphs 22-23 and integrated within the system software, allow continuing identification of such limitations.

9. The Test Guideline is applicable to substances and mixtures. When considering testing of mixtures, difficult-to-test chemicals (e.g. unstable and polymerising substances such as these containing acrylates), or test chemicals not clearly within the applicability domain described in this Guideline, upfront consideration should be given to whether the results of such testing will yield results that are scientifically meaningful, or acceptable for the intended regulatory purpose. In addition, it is important to take into account the mechanistic insight provided by the selected *in vitro* method and how it covers the mechanisms of the test chemical. If appropriate, the use of an additional *in vitro* method, based if possible on different mechanisms of action may be considered, as outlined in OECD GD263 (2).

10. Performance of the macromolecular test method was evaluated using weighted calculation of individual predictions from each qualified result for each chemical used in the validation study in each of the participating laboratories, as recommend EURL-

ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) (10)¹. When used to identify chemicals inducing serious eye damage, i.e., chemicals to be classified as UN GHS Category 1, the *in vitro* macromolecular test method was found to have an overall accuracy of 75% (66.5/89), a specificity of 81% (55.8/69), a sensitivity of 54% (10.7/20), as compared to *in vivo* rabbit eye test method data classified according to the UN GHS (1) (9) with the *in vivo* rabbit eye test bearing their own uncertainties as summarized elsewhere (2). These results include the UN GHS Cat. 1 chemical Tetraethylene glycol diacrylate (CAS 17831-71-9) which is unstable, light sensitive polymerising agent identified as generating negative results with other adopted eye irritation assays. If this difficult to test chemical was not considered in the performance analysis, the *in vitro* macromolecular test method shows an overall accuracy of 76% (66.5/88), a specificity of 81% (55.8/69), a sensitivity of 56% (10.7/19), a false positive rate of 19% (13.1/69) and a false negative rate of 44% (8.3/19). When used for this purpose, test chemicals classified based only on persistent but non severe effects *in vivo* were found to have higher risks of underprediction (5 out of 7). However, false negative rates in this context (i.e. *in vivo* UN GHS Category 1 identified as not being UN GHS Category 1 by the test) are not critical since all test chemicals that come out negative would be subsequently tested with other adequately validated *in vitro* test(s), or as a last option in rabbits, depending on regulatory requirements, using a sequential testing strategy in a weight-of-evidence approach according to the OECD GD 263 (2).

11. When used to identify chemicals that do not require classification for eye irritation and serious eye damage, the *in vitro* macromolecular test method was found to have an overall accuracy of 75% (67.0/89), a sensitivity of 91% (41.7/46) and a specificity of 59% (25.3/43) calculated based on a weighted approach as compared to *in vivo* rabbit eye test method data classified according to the UN GHS (1) (9) with the *in vivo* rabbit eye test bearing their own uncertainties as summarized elsewhere (2). These results include nevertheless the UN GHS Cat. 1 the chemical Tetraethylene glycol diacrylate (CAS 17831-71-9) which is an unstable, light sensitive polymerising agent identified as generating negative results with other adopted eye irritation assays. If this difficult to test diacrylate chemical was not considered in the performance analysis, the *in vitro* macromolecular test method shows an overall accuracy of 76% (67.0/88), a specificity of 59% (25.3/43), a sensitivity of 93% (41.7/45), a false positive rate of 41% (17.7/43) and a false negative rate of 7% (3.3/45), as compared to *in vivo* rabbit eye test method data classified according to the UN GHS (1) (9). However, false positive rates in this context (UN GHS No Category identified as requiring classification) are not critical since all test chemicals that come out positive would be subsequently tested with other adequately validated *in vitro* test(s), or as a last option in rabbits, depending on regulatory requirements, using a sequential testing strategy in a weight-of-evidence approach according to the OECD GD 263 (2). It should also be noted that under the considerations of the IATA outlined in the OECD GD 263 (2), chemicals containing the acrylate functional group would not be expected to be candidates for testing in the bottom-up approach as this functional group could be associated with skin irritation alerts, thus not consistent with a hypothesis that would initiate a bottom-up approach (see part 2 in the figure 1 in the OECD GD 263 (2)).

12. The *in vitro* macromolecular test method is not recommended for the identification of test chemicals that should be classified irritating to eyes (i.e., UN GHS Category 2 or

¹ Performance calculated based on the majority results is comparable (9/10)

Category 2A) or test chemicals that should be classified as irritating to eyes (UN GHS Category 2B) due to the considerable number of *in vivo* UN GHS Category 1 chemicals underclassified as UN GHS Category 2, 2A or 2B and of *in vivo* UN GHS No Category chemicals overclassified as UN GHS Category 2, 2A or 2B. For this purpose, further information and/or testing with other test methods will be required for classification purposes according to the IATA guidance document (2).

PRINCIPLE OF THE TEST

13. The *in vitro* macromolecular test method Ocular Irritation* consists of two components: a macromolecular matrix and a membrane disc for the controlled delivery of the test chemical to the macromolecular matrix. It is an acellular biochemical test system and does not address the cytotoxicity aspect of ocular toxicity. The macromolecular matrix serves as the target for the test chemical and is composed of a mixture of proteins, glycoproteins, carbohydrates, lipids and low molecular weight components forming a gel matrix. The protein oligomers which are part of the matrix self-associate to form larger fibrils that are held together by non-covalent forces. The macromolecular matrix, when rehydrated with a buffered salt solution, forms a highly ordered and transparent structure. Test chemicals causing ocular damage are known to produce denaturation of collagen and saponification of lipids (e.g., by alkalis), coagulation and precipitation of proteins (e.g., by acids) and/or dissolvance of lipids (e.g., by solvents) (12). Test chemicals producing protein denaturation, unfolding and changes in conformation will lead to the disruption and disaggregation of the highly organized macromolecular reagent matrix, and produce turbidity of the macromolecular reagent. Such phenomena is quantified, by measuring the changes in light scattering (at a wavelength of 405 nm using a spectrometer), which is compared to the standard curve established in parallel by measuring the increase in OD produced by a set of calibration substances. The standard curve is used for deriving an Irritation Draize Equivalent (IDE) Score for each tested dose/concentration of the test chemical (described in detail in paragraph 19). The highest IDE Score of the five tested doses/concentrations of a test chemical, namely Maximal Qualified Score (MQS), is then used to determine an UN GHS ocular hazard category based on pre-defined cut-off values (see paragraph 22).

DEMONSTRATION OF PROFICIENCY

14. For any laboratory establishing the *in vitro* macromolecular test method, the proficiency chemicals provided in Annex 3 should be used. A laboratory should use these chemicals to demonstrate their technical competence in performing the *in vitro* macromolecular test method prior to submitting its results for regulatory hazard classification purposes.

PROCEDURE

15. Ocular Irritation* is the only *in vitro* macromolecular test method currently covered by this Test Guideline. The protocol for this test method is available and should be employed when implementing and using the test method in a laboratory (11). The

following paragraphs describe the main components and procedures of the *in vitro* macromolecular test method based on the Ocular Irritation[®] protocol.

Characterisation of the test chemical

16. The pH of a 10% water solution of the test chemical is measured to determine whether it falls within the applicability domain of the test. Detailed procedures for pH measurement for chemicals with different degree of solubility are described in the test protocol (11). In addition, for test chemicals for which surfactant properties have not been clearly identified, the foam test is performed as described in the protocol (11) to determine the appropriate test chemical application procedure described in paragraph 18. The foam test evaluates the proportion and the persistence of the foam layer generated after 10 seconds of vortexing of the 10% solution of the test chemical (11).

Reagent preparation and activation

17. As a basis of the Ocular Irritation[®] *in vitro* macromolecular test method, a macromolecular matrix is prepared by dissolving the reagent powder provided within the kit into a hydrating solution, and filtering the dissolved reagent. The resulting pH and temperature should fall within pre-established ranges (i.e. pH range of 7.9-8.2 and temperature range of 20-25°C). Furthermore, the reagent solution (as well as the blanking buffer conducted in parallel for each tested dose/concentration) should be activated using an activator buffered solution, to reduce the pH of the reagent solution and initiate formation of the ordered macromolecular matrix. The resulting pH of the activated reagent solution should fall within pre-established pH ranges (i.e. 6.4-6.7 in the case of Ocular Irritation[®]) at ambient temperature (20-25°C). Aliquots of the activated protein matrix reagent solution are transferred to a 24-well plate.

Application of Test Chemicals

18. Test chemicals are applied at room temperature (20-25°C) directly onto the macromolecular matrix or over a cellulose membrane based on their physico-chemical properties (Figure 1 in Annex 2a). For solids, non-surfactants or unknown test chemicals characterized as not having surfactant-like properties based on the foam test described in paragraph 16 and in the test protocol (11), a series of five doses (i.e., 25, 50, 75, 100 and 125 µl for liquids and mg for solids) are applied neat onto the membrane disc placed over the matrix reagent. Solids may be ground to ensure the test chemical is evenly spread over the entire surface of the membrane. Known surfactants and unknown test chemicals characterized to have surfactant-like properties based on the foam test (11), are first diluted to form 5% working solutions in distilled water, and 125 µl of a series of five two-fold dilutions (i.e., 0.3125%, 0.625%, 1.25%, 2.5% and 5%) are applied directly into the macromolecular activated reagent followed by the membrane disc which is applied over the well (Annex 2a). Waxy solid (pieces) test chemicals are applied undiluted also directly to the reagent solution and covered by the membrane disc (Annex 2a).

19. The macromolecular matrix of the Ocular Irritation[®] test method is exposed to the test chemicals and concurrent controls for 24.0 ± 0.5 hours in an incubator maintained at $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Following this exposure period, the test system is checked visually. For non-surfactant test chemicals (or unknown test chemicals characterized not to have surfactant-like properties based on the foam test (11)), the membrane discs should be

intact and not damaged. Furthermore wells with reduced volumes may be indicative of possible hygroscopic effects or technical problems. In this case the experiment shall be repeated once, and if the same effects are observed again, the test chemical is then considered to be excluded or incompatible with the test method.

Control Chemicals

20. Concurrent controls should be tested in parallel to the test chemical. In the case of Ocular Irritation®, these include 4 calibrating chemicals and two quality control (QC) chemicals provided within the commercial kit (see Annex 1 for definitions). The calibrating chemicals include four chemicals with UN GHS classification (1) ranging from No Category to Category 1 and cover a defined range of OD responses (Table 1) which are used to derive the standard curve for Irritation Draize Equivalent (IDE) Score determination (described in paragraph 21 and Annex 2b). The two QC chemicals have defined ranges of IDE scores associated with their irritation potential which falls close to the prediction model cut-offs.

IDE and MQS score determination

21. Following incubation test chemicals and controls (see paragraph 20) are transferred to a 96 well plate for OD reading at 405nm. The process of transfer is described in detail and illustrated in the protocol within the kit (11). The raw OD readings from each well are obtained and the IDE scores for the QCs and test chemicals are calculated by the software following the formulas outlined in Annex 2b. MQS for a test chemical is determined from a single test run qualified as appropriate based on the analysis of the OD scores for the calibrators and QC chemicals (paragraph 22) as well as aspects of the dose response generated with the five tested doses/concentrations of test chemical (paragraph 23).

DATA AND REPORTING

Study Acceptance Criteria

22. Qualified results in the VRM Ocular Irritation® are determined by the software which automatically performs for the following qualification check:

- §Test run qualification check: One of two criteria relating to four calibrators and two Quality Controls must be met for a test run to be accepted as *Qualified* for further data analysis:
 - The values obtained for all four calibrators and for at least one of two Quality Controls are within the pre-established accepted ranges (Table 1); or
 - The values obtained for any three of four calibrators, and for both Quality Controls are within the pre-established accepted ranges (Table 1). If only one calibrator is out of its acceptance range, the OI® software substitutes a pre-defined value for generation of the standard curve

An OI® test run is considered Non-Qualified (NQ) when either two (or more) calibrators are out of range, or when one calibrator and one Quality Control are out of range.

Table 1. Acceptance criteria for calibrators and quality control chemicals in the Ocular Irritation® test method

Acceptance OD ₄₀₅ range	
Calibrator 0	0.062 - 0.262
Calibrator 1	0.089 – 0.315
Calibrator 2	0.351 - 0.945
Calibrator 3	1.277 – 2.127
Acceptance IDE range	
QC 1	7.2-20.8
QC 2	23.6-35.6

23. The following additional checks are performed by the software and prompt further interpretation of the series of the five data points for the test chemical and controls before acceptable MQS can be determination (see paragraph 24) for the test chemical. Result from a qualified test run can be excluded based on consideration of the following checks:

- Net Optical Density Check: The Net OD_x for a test chemical should be greater than the pre-established value (i.e. > -0.015). When a test chemical Net OD_x is < -0.015, a meaningful IDE Score cannot be calculated by linear extrapolation and the test result is excluded from consideration for MQS determination.
- If the Net OD_x for a test chemical in a qualified run is below OD_{Cal 2}, an additional check is prompted to verify that the macromolecular matrix is responding properly. This check is performed by addition of an inhibition check solution provided in the test kit followed by re-measuring the OD_x which should fall above OD_{Cal 2} for the data to qualify/be accepted for further interpretation.
- Blank OD value check: Blank OD corresponding to any of the test chemical dose/concentrations greater than 1.2 indicates interference by the test substance (i.e. intense colouration). The test chemical with the corresponding blank control may be re-tested at least once more to confirm colour interference and excluded test result status.
- Finally, a dose response check is conducted to verify that the test chemical dose response is consistent with a typical pattern characteristic for known types of correctly predicted chemicals. If the dose response for a test chemical has an atypical/irregular pattern, the IDE results should be excluded from consideration for MQS determination. Examples of appropriate qualified dose response curves are presented in the protocol provided with the kit (8).

Interpretation of Results and Prediction Model

24. The optical density (OD_{405}) obtained with a qualified test chemical is compared to the standard curve obtained with the set of calibrators, to derive an Irritation Draize Equivalent (IDE) Score, for each tested dose/concentration. The highest obtained IDE score, named the Maximal Qualified Score (MQS), is then used to predict the ocular hazard potential of the test chemical according to the UN GHS classification system (1). In the case of the Ocular Irritation[®] *in vitro* macromolecular test method the Prediction Model described in table 2 is used.

Table 2. Ocular Irritation prediction[®] model

Maximal Qualified Score (MQS)	Predicted UN GHS classification**
0 – 12.5	No Category
> 12.5 – 30.0	No Prediction Can be Made*
> 30.0	Category 1

* If the MQS result is > 12.5 – 30.0 No final Prediction Can be made (NPCM) from this result in isolation. This is because a considerable number of *in vivo* UN GHS Category 1 chemicals showed MQS within this interval (paragraph 10) and were therefore under-predicted with the macromolecular test assay. In addition, considerable number of *in vivo* UN GHS No Category showed MQS within this interval i.e. were over-predicted (paragraph 11). For final classification of chemicals with MQS in the interval > 12.5 – 30.0, further information and/or testing with other test methods will be required according to the IATA guidance document (2).

**Consideration would need to be given to all possible mechanisms of ocular toxicity that may be relevant to the test chemical, based on existing data and knowledge as outlined in GD263 (2) when deriving a classification.

Test report

25. The test report should include the following information relevant to the conduct of the study:

Test and Control Chemicals

- Chemical identification, such as IUPAC or CAS name(s), CAS registry number(s), SMILES or InChI code, structural formula, and/or other identifiers;
- Purity and composition of the test/control substance or mixture (in percentage(s) by weight), to the extent this information is available;
- In case of multi-constituent test chemicals and UVCB: characterization as far as possible by e.g., chemical identity (see above), purity, quantitative occurrence and relevant physicochemical properties (see above) of the constituents, to the extent available;
- Physicochemical properties such as physical state, volatility, pH, stability, chemical class, water solubility relevant to the conduct of the study, colour, optical density or absorbance characteristics;

© OECD, (2019)

- pH of the 10% solution of the test chemical determined as described in the protocol (11);
 - Outcome of the foam test if surfactant properties are not defined by supplier of test chemical;
 - Treatment of the test/control chemical prior to testing, if applicable (e.g., warming, grinding);
 - Storage conditions and stability to the extent available;
- Solvent or Vehicle, if applicable

Information Concerning the Sponsor and the Test Facility

- Name and address of the sponsor, test facility and study director;

Test Method Conditions

- Description of test system used;
- The procedure used to ensure the performance (i.e., accuracy and reliability) of the test method over time (e.g., periodic testing of proficiency chemicals).

Test Procedure

- Number of test dose/concentrations used;
- Identity of the solvent and benchmark controls, if applicable;
- Test chemical dose, application and exposure time used;
- Description of any modifications to the test procedure, if applicable.

Results

- Tabulation of the OD₄₀₅ for calibrators and Quality Controls with outcome for the acceptance criteria for the test run: Qualified or Not-Qualified assay (Unqualified)
- Tabulation of the OD₄₀₅, Net OD₄₀₅ and IDE scores obtained for each individual test chemical dose;
- Results of applicability criteria checks for the test chemicals: i.e. excluded result or a prompt/flag for retesting
- Results from re-testing, if applicable
- Description of any other effects observed at the end of the procedure e.g. membrane intactness, condensation on plate cover indicating evaporation, volume reduction; coloration
- The Maximal Qualified Score, and its predicted *in vitro* UN GHS Category;

Discussion of the Results

Conclusion

LITERATURE

1. United nations (UN) (2017). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Seventh revised edition, UN New York and Geneva, 2017. Available at: https://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev07/English/03e_part3.
2. OECD (2018). Guidance Document on an Integrated Approach on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye Irritation. Series on Testing and Assessment, No. 263. Environment, Health and Safety Publications, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France. Available at: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2017\)15&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2017)15&doclanguage=en)
3. Scott L, Eskes C, Hoffman S, Adriaens E, Alepee N, Bufo M, Clothier R, Facchini D, Faller C, Guest R, Hamemik K, Harbell J, Hartung T, Kamp H, Le Varlet B, Meloni M, McNamee P, Osborn R, Pape W, Pfannenbecker U, Prinsen M, Seaman C, Spielmann H, Stokes W, Trouba K, Vassallo M, Van den Berghe C, Van Goethem F, Vinardell P, Zuang V (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-up and Top-down Approaches. *Toxicology In Vitro* 24, 1-9.
4. Barroso J., Pfannenbecker U., Adriaens E., Alépée N., Cluzel M., De Smedt A., Hibatallah J., Klaric M., Mewes K.R., Millet M., Tempier M., McNamee P. (2017). Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation *in vivo* data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). *Archives of Toxicology* 91, 521-547.
5. Gordon V (1992). The scientific basis of the EYTEX™ system. *ATLA* 20, 537-540
6. Kelly C (1989). EYTEX An *in vitro* method of predicting ocular toxicity. *Pharmacoepial forum*, p 4815
7. OECD (2019). Series on Testing and Assessment No. 312: Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Macromolecular Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage.
8. OECD (2005). OECD Series on Testing and Assessment No. 34. Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Available at: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
9. Eskes C, Hoffmann S, Facchini D, Ulmer R, Wang A, Flego M, Vassallo M, Bufo M, van Vliet E, d'Abrosca F, Wilt N (2014). Validation Study on the Ocular Irritation® Assay for Eye Irritation Testing. *Toxicology In Vitro* 28, 1046-1065.
10. ESAC (2016). EURL ECVAM Scientific Advisory Committee Opinion on the Ocular Irritation® test method for prediction of serious eye damage/ eye irritation potential of chemicals. ESAC Opinion No.

2016-01 of 24 June 2016; EUR 28174 EN; doi:10.2787/991443. Available at: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103703>.

11. DB-ALM (INVITTOX) (2013). Protocol 157: Ocular Irritection® Assay System, 25pp. Available: <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu>.
12. Eskes C. (2010). Guidance Document on the Application of Alternative methods in the Regulatory Assessment of Chemical Safety Related to Human Eye Irritation and Severe Irritation: Current Status and Future Prospects. FOPH, 65 pp. Available at: <http://www.bag.admin.ch/themen/chemikalien/00253/03225/12694/index.html?lang=fr>
13. OECD (2017). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France. Available at: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects_20745788.

Annex 1

DEFINITIONS

Accuracy: The closeness of agreement between test method results and accepted reference values. It is a measure of test method performance and one aspect of "relevance." The term is often used interchangeably with "concordance", to mean the proportion of correct outcomes of a test method (8).

Activator: Solution employed to initiate formation of the ordered macromolecular matrix when the protein has been rehydrated.

Benchmark chemical: A chemical used as a standard for comparison to a test chemical. A benchmark chemical should have the following properties: (i), a consistent and reliable source(s); (ii), structural and functional similarity to the class of chemicals being tested; (iii), known physical/chemical characteristics; (iv) supporting data on known effects; and (v), known potency in the range of the desired response.

Blanking buffer: A control solution used to account for the background contribution of the test chemical to the OD₄₉₅ readings in the test system. .

Bottom-Up Approach: step-wise approach used for a chemical suspected of not requiring classification for eye irritation or serious eye damage, which starts with the determination of chemicals not requiring classification (negative outcome) from other chemicals (positive outcome) (2) (3).

Calibrators: Four defined irritant solutions (Cal 0, 1, 2 and 3) having well characterized IDE scores in the Ocular Irritation® test method. The calibrators are used to derive a standard curve with which the results of the test method are compared to, and ensure optimal performance.

Cornea: The transparent part of the front of the eyeball that covers the iris and pupil and admits light to the interior.

Eye Irritation: Production of changes in the eye, which are fully reversible, occurring after the exposure of the eye to a substance or mixture. Interchangeable with "Reversible effects on the Eye" and with "UN GHS Category 2" (1).

False negative rate: The proportion of all positive chemicals falsely identified by a test method as negative. It is one indicator of test method performance.

False positive rate: The proportion of all negative chemicals that are falsely identified by a test method as positive. It is one indicator of test method performance.

Foam test: employed to determine whether the unknown substance should be tested utilizing surfactant or non-surfactant application procedure (11).

Hazard: Inherent property of an agent or situation having the potential to cause adverse effects when an organism, system or (sub) population is exposed to that agent.

Hydrating Solution: Solution employed to rehydrate the reagent powder and facilitate formation of the ordered protein matrix.

IATA: Integrated Approach on Testing and Assessment -A structured approach used for hazard identification (potential), hazard characterisation (potency) and/or safety assessment (potential/potency and exposure) of a chemical or group of chemicals, which strategically integrates and weights all relevant data to inform regulatory decision regarding potential hazard and/or risk and/or the need for further targeted and therefore minimal testing.

Inhibition check solution: An irritating substance known to quickly react with the macromolecular reagent and produce evident turbidity, which can be employed to verify the functionality of macromolecular reagent when the OD readings of qualified test chemical doses/concentrations are less than Calibrator 2. Application of the inhibition check solution verifies that the macromolecular reagent in those wells is still able to produce evident turbidity (e.g., > OD Calibrator 2) and identifies inaccurate low OD reading (or inaccurate non-irritant) results when the turbidity is less than OD Calibrator 2.

Irreversible effects on the eye: see "Serious eye damage" and "UN GHS Category 1".

Irritation Draize Equivalent (IDE) Score: A numerical score derived from the optical density measurement of the Ocular Irritation® test method for a tested dose/concentration when compared to the curve obtained with the calibrators.

Maximal Qualified Score (MQS): Represents the highest IDE score obtained from the different tested doses/concentrations of a test chemical. Ranging from 0 to 51 it is used to predict the irritation potential of the test chemical.

Membrane discs: A semi-permeable membrane that facilitates controlled delivery of the test chemical into the protein reagent.

Mixture: A mixture or a solution composed of two or more substances in which they do not react (1).

Net Optical Density Check: Provides a measure of the net optical density by measuring the OD of the activated protein reagent and subtracting the OD of the activated blanking buffer. The Net OD ($OD_{\text{reagent}} - OD_{\text{blank}} = OD_{\text{Net}}$) should be $> - 0.015$.

Not Classified: Test chemicals that are not classified for eye irritation (UN GHS Category 2) or serious damage to eye (UN GHS Category 1). The term is interchangeable with "UN GHS No Category".

Quality Control chemicals: Two defined irritant solutions (QC1 and QC2) with well-characterized IDE scores that lie within the lower (7.2-20.8) and mid-upper range (23.6-35.6) of the Ocular Irritation® test method. The quality control check verifies that the method is functioning properly and can correctly detect eye irritation potency in the lower and mid/upper IDE ranges.

Reagent Powder: Consists of a mixture of proteins, glycoproteins, carbohydrates, lipids and low molecular weight components. When hydrated, the reagent powder forms a solution containing an ordered

macromolecular matrix. Proteins in this solution undergo changes in conformation when exposed to an irritant test chemical.

Reliability: Measures of the extent that a test method can be performed reproducibly within and between laboratories over time, when performed using the same protocol. It is assessed by calculating intra- and inter-laboratory reproducibility and intra-laboratory repeatability (8).

Reversible effects on the Eye: see "Eye Irritation" and "UN GHS Category 2".

Sensitivity: The proportion of all positive/active test chemicals that are correctly classified by the test. It is a measure of accuracy for a test method that produces categorical results, and is an important consideration in assessing the relevance of a test method (8).

Serious eye damage: Production of tissue damage in the eye, or serious physical decay of vision, which is not fully reversible occurring after exposure of the eye to a substance or mixture. Interchangeable with "Irreversible effects on the eye" and with "UN GHS Category 1" (1)

Solvent/vehicle control: An untreated sample containing all components of a test system, including the solvent or vehicle that is processed with the test chemical-treated and other control samples to establish the baseline response for the samples treated with the test chemical dissolved in the same solvent or vehicle. When tested with a concurrent negative control, this sample also demonstrates whether the solvent or vehicle interacts with the test system.

Specificity: The proportion of all negative/inactive test chemicals that are correctly classified by the test. It is a measure of accuracy for a test method that produces categorical results and is an important consideration in assessing the relevance of a test method (8).

Substance: Chemical elements and their compounds in the natural state or obtained by any production process, including any additive necessary to preserve the stability of the product and any impurities deriving from the process used, but excluding any solvent which may be separated without affecting the stability of the substance or changing its composition (1).

Surfactants: Also called surface-active agent, this is a substance and/or its dilution (in an appropriate solvent/vehicle), which consists of one or more hydrophilic and one or more hydrophobic groups, that is capable of reducing the surface tension of a liquid and of forming spreading or adsorption monolayers at the water-air interface, and/or of forming emulsions and/or microemulsions and/or micelles, and/or of adsorption at water-solid interfaces.

Top-Down Approach: step-wise approach used for a chemical suspected of causing serious eye damage, which starts with the determination of chemicals inducing serious eye damage (positive outcome) from other chemicals (negative outcome) (2) (3).

Test chemical: Chemical (substance or mixture) assessed in the test method.

Tiered testing strategy: A stepwise testing strategy where all existing information on a test chemical is reviewed, in a specified order, using a weight-of-evidence process at each tier to determine if sufficient information is available for a hazard classification decision, prior to progression to the next tier. If the irritancy potential of a test chemical can be assigned based on the existing information, no additional testing is required. If the irritancy potential of a test chemical cannot be assigned based on the existing information,

a step-wise sequential animal testing procedure is performed until an unequivocal classification can be made (2) (3).

United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (UN GHS): A system proposing the classification of chemicals (substances and mixtures) according to standardized types and levels of physical, health and environmental hazards, and addressing corresponding communication elements, such as pictograms, signal words, hazard statements, precautionary statements and safety data sheets, so that to convey information on their adverse effects with a view to protect people (including employers, workers, transporters, consumers and emergency responders) and the environment (1).

UN GHS Category 1: see "Serious damage to eyes" and/or "Irreversible effects on the eye".

UN GHS Category 2: see "Eye Irritation" and/or "Reversible effects to the eye".

UN No Category: Test chemicals that do not meet the requirements for classification as UN GHS Category 1 or 2 (2A or 2B). Interchangeable with "Not classified".

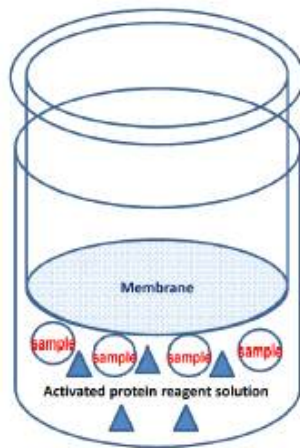
Validated Reference Method(s) (VRM(s)): one (or more) test method(s) that was(were) used to develop the related official Test Guidelines and Performance Standards (PS). The VRM(s) is(are) considered the reference test method(s) to compare new proposed similar or modified test methods in the framework of a PS-based validation study.

Weight-of-evidence: The process of considering the strengths and weaknesses of various pieces of information in reaching and supporting a conclusion concerning the hazard potential of a chemical.

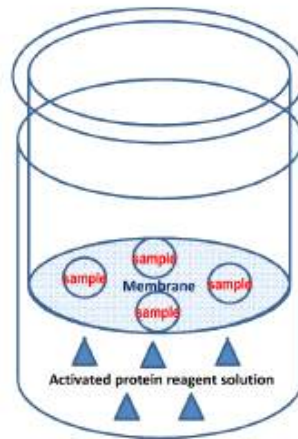
ANNEX 2a

Illustration to paragraph 18

Application of test materials



For surfactant & Non-surfactant Waxy Solid



For Non-surfactant (except waxy solid)

Details of IDE score determination by the software (cf. to paragraph 21)

After incubation, the raw OD₄₀₅ readings for the test chemicals and controls are collected by the spectrophotometer (as described in paragraph 21) and IDE scores are calculated by the integrated software using the following formulas:

Equation 1: When OD_{QC1,2} or Net OD_x < OD_{Cal 1}, then:

$$IDE = (OD_{QC1,2} \text{ or Net } OD_x / OD_{Cal 1}) \times 12.5$$

Equation 2: When OD_{Cal 1} < OD_{QC1,2} or Net OD_x < OD_{Cal 2}, then:

$$IDE = [(OD_{QC1,2} \text{ or Net } OD_x - OD_{Cal 1}) / (OD_{Cal 2} - OD_{Cal 1})] \times 17.5 + 12.5$$

Equation 3: When OD_{Cal 2} < OD_{QC1, 2} or Net OD_x < OD_{Cal 3}, then:

$$IDE = [(OD_{QC1,2} \text{ or Net } OD_x - OD_{Cal 2}) / (OD_{Cal 3} - OD_{Cal 2})] \times 21.0 + 30$$

When Test Chemical Net OD_x is > OD_{Cal 3}, the IDE Score cannot be calculated by linear extrapolation because there is no greater calibrator value.

Net OD_x for Test Chemical = Reagent OD_x - Blanking buffer OD_x, accounts for the potential background reading from the test chemical

Where:

x is the dose or concentration of test chemical.

Reagent OD represents the Test Chemical reading in the well containing reagent solution

Blank OD represents reading in the well containing the test chemical in blanking buffer.

OD_{QC1,2} and OD_{Cal 1,2,3} represent the OD reading for Calibrators (Cal) and Quality Control (QC) chemicals in the wells containing the reagent solution. Those control chemicals are known not to contribute to the background readings at 405nm.

ANNEX 3

Proficiency chemicals for the *In vitro* Macromolecular Test Method

Prior to routine use of a test method that adheres to this Test Guideline, laboratories should demonstrate technical proficiency by correctly identifying the eye hazard classification of the 12 chemicals recommended in Table 1. The Ocular Irritation⁸ *in vitro* macromolecular test method outcomes provided represent examples of the results observed during its validation study (9). As recommended by OECD GD 34², the selection includes, to the extent possible, chemicals that: (i) cover the full range of *in vivo* serious eye damage/eye irritation responses based on the UN GHS classification system (i.e., Categories 1, 2A, 2B or No Category); (ii) are based on quality results obtained by the reference *in vivo* rabbit eye test (OECD TG 405) (4) (11); (iii) cover different physical states; (iv) cover a broad range of the chemical classes and organic functional groups, representative of those used in the validation study (9); (v) cover the range of *in vitro* responses based on high quality Ocular Irritation⁸ data (0 to 51 MQS); (vi) produced correct and reproducible predictions in the VRM; (vii) are commercially available; and (viii) are not associated with prohibitive acquisition and/or disposal costs. In situations where a listed chemical is unavailable or cannot be used for other justified reasons, another chemical fulfilling the criteria described above, e.g. from the chemicals used in the validation of the Ocular Irritation⁸ *in vitro* macromolecular test method or listed as a reference chemical within the Performance Standards (OECD, 2019) could be used (7)(9). Such deviations should however be justified.

² OECD Guidance Document 34 - *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment* (OECD GD 34).

Table 1: Recommended chemicals for demonstrating technical proficiency with the Ocular Irritation® *in vitro* macromolecular test method.

Chemical name	CASRN	<i>In vivo</i> UN GHS	Physical state	pH ^a	MQS range/ n= runs Average (SD)	VRM Prediction (7)
3-methylresorcinol	608-25-3	Category 1	Solid	5.8	>51/ n=9 n.a. (n.a.)	Cat. 1
4-tert-butylcatechol	98-29-3	Category 1	Solid	5.5	>51/ n=9 n.a. (n.a.)	Cat. 1
Benzalkonium chloride (5%)	63449-41-2	Category 1	Liquid	6.5	49.5/ n=1 n.a. (n.a.)	Cat. 1 ^b
Promethazine hydrochloride	58-33-3	Category 1	Solid	4.5	>51/ n=9 n.a. (n.a.)	Cat. 1
Ammonium nitrate	6484-52-2	Category 2A	Solid	4.8	14.1-27.3/ n=12 20.2 (3.0)	NPCM
Cetylpyridinium bromide (1%)	140-72-7	Category 2A	Liquid	4.7	15/ n=1 n.a. (n.a.)	NPCM ^b
Methyl acetate	79-20-9	Category 2A	Liquid	6.8	15.0-21.1/ n=12 18.6 (1.5)	NPCM
Sodium benzoate	532-32-1	Category 2A	Solid	8.2	7.4-20/ n=9 15.4 (2.5)	NPCM
1,5-dibromopentane	111-24-0	No category	Liquid	5.7	6.7-10.3/ n=9 8.6(1.0)	No Cat.
Cetyl pyridinium bromide 0.1%	140-72-7	No category	Liquid	7.1	4-12.5/ n=10 6.8 (1.5)	No Cat.
Myristyl myristate	3234-85-3	No category	Solid	6.3	2.7-6.5/ n=9 4.6 (1.3)	No Cat.
Potassium tetrafluoroborate	14075-53-7	No category	Solid	4.5	6.8-19.2/ n=11 9.9 (2.1)	No Cat.

Abbreviations: CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number; Cat.: category; n.a.: not available; NPCM: No Prediction Can be Made; UN GHS = United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (1).

^a The pH values are rounded to one decimal point, and values were obtained from the original sources as indicated in (11).

^b Test chemicals having limited data in within- and between- laboratory reproducibility but included as representing relevant chemistries and/or outcome.

“화장품 안자극 동물대체시험법(*In vitro* 고분자시험법: Ocular Irritection®)

가이드라인(민원인 안내서)”

발행일	2021년 9월
발행인	식품의약품안전평가원장 서경원
편집위원장	독성평가연구부장 정자영
편집위원	윤혜성, 김광진, 윤소영, 강남희, 이정선, 홍미혜, 윤남희, 차민희
도움주신분	정태천(영남대학교), 김배환(계명대학교), 조선아(아모레퍼시픽)
문의처	식품의약품안전평가원, 특수독성과 Tel : 043-719-5153, 5155 Fax : 043-719-5150
주소	충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명 2로 187, 오송보건의료행정타운 식품의약품안전처 식품의약품안전평가원

공익신고자 보호제도란?

- 공익신고자(친족 또는 동거인 포함)등이 공익신고 등으로 인하여 피해를 받지 않도록 **비밀보장, 불이익보호조치, 신분보호조치** 등을 통하여 보호하는 제도

[공직자 부조리 및 공직신고안내]

- ▶ 부조리 신고 : 식약처 홈페이지 “국민신문고 > 공직자 부조리 신고” 코너
- ▶ 공익 신고 : 식약처 홈페이지 “국민소통 > 신고 센터 > 부패·공익신고 상담” 코너

♣ 보호조치 요구 방법

우편(30102) 세종특별자치시 도움5로 20 정부세종청사 7동, 국민권익위원회 공익보호지원과.

전화 044-200-7773