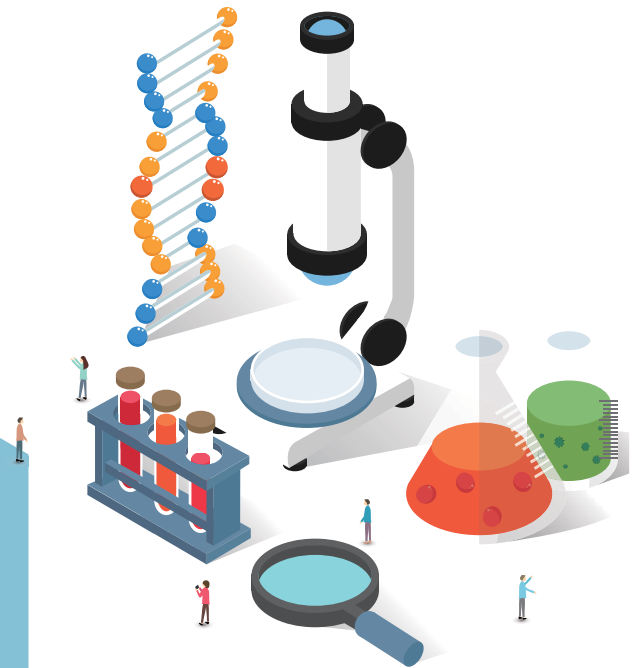


국민 안전이 기준입니다
YOUR SAFETY IS OUR STANDARD

화장품 등 안자극 동물대체시험법 가이드라인

닭의 안구를 이용한 안점막자극 시험법

2021. 8.



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

지침서 · 안내서 제 · 개정 점검표

명칭	화장품 등 안자극 동물대체시험법(닭의 안구를 이용한 안점막자극 시험법) 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 확인사항	<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 8 월 31일

담당자
확 인(부서장)

강남희
김광진

이 안내서는 화장품 등 안자극 동물대체시험법(닭의 안구를 이용한 안점막자극 시험법) 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 8월 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	B1-2015-4-001	2015.5.21	화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인(VI) 제정
2	안내서-0754-01	2017.5.16	「식약처 지침서등의 관리에 관한 규정」 개정에 따른 일괄 재분류 (규제개혁담당관실-3761호,2017.5.16.)
3	안내서-0754-02	2021.8.	OECD 가이드라인(TG 438) 개정사항 반영

I. 개 요	1
II. 시험원리	2
III. 제한점 및 고려사항	2
IV. 시험방법	3
V. 인정요건	11
VI. 시험결과 및 보고	12
[별첨 1] 번역본(OECD TG 438)	15
[별첨 2] 원 문(OECD TG 438)	53



I 개 요

본 시험법은 적출된 닭의 안구에서 시험물질에 의한 각막의 손상 정도를 측정하여 UN GHS에 따른 심한 안손상을 유발하는 화학물질(UN GHS Category 1) 및 안자극 또는 심한 안손상에 대한 분류 및 표시가 필요하지 않은 화학물질(UN GHS No Category)을 식별하는 생체외(*in vitro*) 시험법(닭의 안구를 이용한 안점막자극 시험법, Isolated Chicken Eye Test Method, ICE)이다.

시험물질에 의한 손상은 (i) 각막 두께 증가(종창, swelling)의 정량적 평가, (ii) 각막 혼탁도(opacity)의 정성적 평가, (iii) 플루오레세인 잔류도(fluorescein retention)의 정성적 평가, (iv) 형태학적 영향(morphological effect)의 정성적 평가로 측정된다. 각막 혼탁, 각막 종창 및 플루오레세인 잔류도를 개별적으로 평가한 후 이를 종합하거나 형태학적 영향 평가 결과(상피의 심한 이완)에 따라 시험물질의 안구 유해성을 분류한다. 추가적으로 UN GHS Category 1 중 pH가 극단적이지 않은(non-extreme, $2 < \text{pH} < 11.5$) 세정제 및 계면활성제를 더 정확하게 식별하기 위해 조직병리 평가를 사용할 수 있다.

실험실은 본 시험법을 일반적으로 사용하기 전에 가이드라인에서 제시된 13개의 숙련도 물질(별첨 1의 부록 2)을 사용하여 기술적 숙련도를 입증해야 한다. 그리고 가이드라인에서 제시하고 있는 인정요건을 만족시키는 결과 값만이 유효한 것으로 인정한다.

II 시험원리

ICE 시험법은 생체외(*in vitro*) 닭 안구에 시험물질을 처리하여 시험물질에 의한 각막 손상을 측정하며, 각막 종창, 혼탁도, 플루오레세인 잔류도를 평가한다. 각막 종창은 세극등현미경(*slit-lamp microscope*)의 두께측정기를 이용하여 정량적으로 평가하며, 각막 종창과는 별도로 각막 혼탁도 및 플루오레세인 잔류도는 세극등현미경을 이용하여 관찰 사항에 따라 점수화되어 정성적으로 평가한다. 각 평가항목의 측정값 또는 점수에 따라 ICE 분류(I~IV)를 정하며 평가항목들의 ICE 분류 조합을 이용하여 생체외(*in vitro*) 안 유해성을 분류한다.

III 제한점 및 고려사항

본 시험 가이드라인은 고체, 액체, 에멀전 및 젤에 적용 가능하며, 액체는 수용성 또는 비수성, 고체는 물에 수용성 또는 불수용성일 수 있다.

ICE 시험법을 심한 안손상을 유발하는 모든 유형의 화학물질(UN GHS Category 1)의 식별에 사용했을 때, 양성 결과가 나오면 추가 시험 없이 UN GHS Category 1로 판정할 수 있다. 한편, 본 시험법의 제한점은 알코올의 위양성률 및 고체/계면활성제의 위음성률이 높다는 것이다. 또한 생체내(*in vivo*)에서 과도하지 않은 영향(*non severe effects*)을 지속적으로 일으키는 시험물질은 과소예측(*under-prediction*)이 될 수 있다. 그러나 음성으로 판정된 화학물질의 경우 증거의 가중치*(*weight-of-evidence*) 접근방식에 따라 추가적인 시험을 실시하기 때문에 위음성율이 높은 것은 중요하지 않다.

ICE 시험법을 안자극 또는 심한 안손상에 대한 분류가 필요하지 않은 모든 유형의 화학물질(UN GHS No Category)의 식별에 사용했을 때, 음성 결과는 UN GHS No Category로 간주할 수 있다. 단, 검증 연구 데이터베이스에서 오염방지 유기용매를 함유하는 페인트 1종(TNO-94)이 No Category로 판정되는 사례가 있었기 때문에 오염방지 유기용매를 함유하는 페인트의 경우 음성으로 과소예측 될 수 있다.

* 시험물질의 잠재적인 유해성에 관한 결론에 도달하기 위해 활용되는 다양한 정보들의 장단점을 고려하는 과정

본 시험법은 심한 안손상을 유발하거나 안자극 또는 심한 안손상에 대한 분류가 필요하지 않은 화학물질을 식별하는데 사용 하는 것을 권장하지만 안자극 또는 약한 안자극을 유발한다고 분류된 화학물질(UN GHS Category 2/2A 또는 2B)을 식별하는데 권장하지 않는다.

그리고 본 시험법은 화학물질에 대한 UN GHS 분류를 위해 생체내(*in vivo*) 토끼 안자극 시험에서 평가되는 각막, 결막 및 홍채 영향 중 생체내(*in vivo*) 분류의 주요 근거가 되는 각막 영향을 다룬다. 또한 조직병리학적 관찰은 pH가 극단적이지 않은(non-extreme, $2 < \text{pH} < 11.5$) 세정제와 같은 각막 상피층에 비가역적 영향을 유발하는 시험물질을 식별할 수 있다.

본 시험 가이드라인은 새로운 정보와 데이터에 따라 주기적으로 개정될 수 있기 때문에 가능한 한 안구를 보존하고 조직병리 평가 표본을 보관한다.

IV 시험방법

4.1 안구 준비

본 시험법은 도계장에서 식용으로 도축된 생후 약 7주령, 1.5~2.5 kg의 영계(특정일에 같은 그룹 내에서 수집)를 사용하고 닭의 머리를 상온에서 생리식염수를 적신 티슈로 수분이 유지된 플라스틱 상자에 담아 실험실로 신속하게 운송한다. 실험실에 도착한 후 닭의 눈꺼풀을 잘라내고 2%(w/v) 플루오레세인나트륨용액을 적용한 안구를 세극등 현미경으로 관찰하여 플루오레세인 잔류도 및 각막 혼탁도의 점수가 0.5 이하인지 확인한다. 그리고 깜박임막(nictitating membrane)을 잡고 안와(orbit)에서 안구를 잡아당긴 후 눈 근육, 깜박임막 및 다른 결합조직을 제거한다.

안와에서 적출한 안구를 클램프에 올려 각막을 수직으로 위치시킨 후 클램프를 관류장치($32 \pm 1.5^\circ\text{C}$) 안에 놓는다(그림 1)(닭 머리 수집부터 이 과정까지 걸리는 시간을 최소화 함; 일반적으로 2시간 이내). 그리고 각막 전체에 생리식염수가 충분히 닿도록

생리식염수 주입구를 통해 흘러내리게 한다(3~4방울/분 또는 0.1~0.15 mL/분). 위와 같이 다시 안구의 플루오레세인 잔류도와 각막 혼탁도 점수가 0.5 이하인지 확인하고 각막 두께가 시험에 사용할 모든 안구의 평균값에서 차이가 10% 미만인지 확인한다. 또한 안구의 기타 손상 징후가 있는지 확인한다.

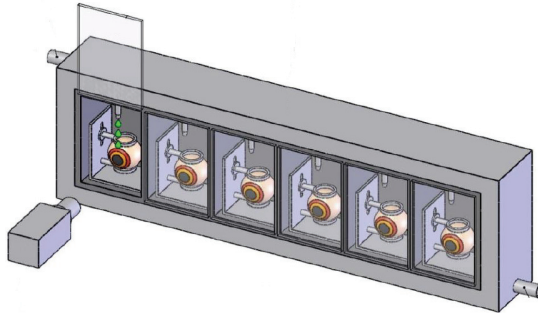


그림 1. 관류장치 안에 수직으로 위치시킨 안구

위의 과정을 통해 안구를 선별한 후 물질 적용 전에 관류장치 내 온도($32 \pm 1.5^\circ\text{C}$)와 평형을 유지하도록 안구를 약 45~60분 동안 배양하고, 기준(baseline)이 되는 각막 두께와 혼탁에 대한 제로(0) 참고 측정값(zero reference measurement)을 기록한다 (예: 시간0).

4.2 시험물질의 적용

제로(0) 참고 측정값을 확인한 직후, 안구를 관류장치에서 꺼내 수평으로 놓고 0.03 mL(액체) 또는 0.03 g(고체)의 시험물질(가능한 곱게 간 상태)을 각막 표면 전체에 고르게 적용한다. 이때 각 시험물질 및 양성대조물질은 최소 3개의 안구에 적용시키고, 음성대조물질 또는 용매대조물질(생리식염수 이외의 용매를 사용하는 경우)은 최소 1개의 안구에 적용시킨다. 상온에서 시험물질(액체 또는 고체)을 10초간 적용하고 생리식염수(약 20 mL)로 안구를 씻어낸다. 세척한 안구 각막에서 시험물질 잔여물이 남아 있으면 안구를 추가로 세척한다. 이후 안구(홀더로 고정)를 처음과 같이 똑바로 세워 다시 관류장치에 수직으로 놓는다.

4.3 대조물질

시험물질과 함께 시험에 음성대조물질 또는 용매/부형제대조물질, 양성대조물질을 포함한다(해당하는 경우 기준물질(benchmark chemical) 포함). 액체 원액 또는 고체로 시험할 경우 생리식염수를 동시 음성대조물질로 사용하며, 희석액으로 시험할 경우 용매/부형제대조물질을 시험에 포함한다.

양성대조군은 UN GHS Category 1 분류기준에 해당하는 반응을 유도하는 물질로서 액체 물질로는 10% 아세트산(acetic acid) 또는 5% 염화벤잘코늄(benzalkonium chloride)을 주로 사용하며, 고체 물질로는 수산화나트륨(sodium hydroxide) 또는 이미다졸(imidazole)을 주로 사용한다.

4.4 평가항목 측정

본 시험법의 평가항목은 각막 혼탁도(opacity), 각막 종창(swelling), 플루오레세인 잔류도(fluorescein retention), 형태학적 영향(morphological effect)이다. 플루오레세인 잔류도는 시험물질 처리 전과 노출 30분 후에만 평가하며, 다른 평가항목들은 시험물질 처리 전 및 처리·세척 후 30, 75, 120, 180, 240분(±5분)이 경과했을 때 각각 평가한다. 또한 평가항목에 대해 기록을 남기기 위해 가능한 한 각막 혼탁도, 플루오레세인 잔류도, 형태학적 영향 및 조직병리 평가(수행하는 경우)의 사진을 찍는다.

평가가 모두 완료된 후에는 특히 pH가 극단적이지 않은(non-extreme, $2 < \text{pH} < 11.5$) 세정제 및 계면활성제에 대해 향후의 조직병리 평가를 위해 적절한 고정액(예: 중성 완충 포르말린)에 안구를 담가 보관하며 OECD GD 160의 조직병리 평가 표본 수집 및 처리에 관한 절차에 따라 수행한다.

4.5 자료평가

각막 종창은 다음의 공식에 따라 각막 두께의 제로(0) 참고 측정값(시간0의 각막 두께)을 기준으로 하여 백분율로 계산한다. 모든 관찰 시점에서 모든 안구에 대한 각막 종창의 평균 백분율을 계산하고, 각 시점에서의 각막 종창의 평균 백분율 중 최고값에 근거하여 시험물질에 대한 ICE 분류를 결정한다.

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

각막 혼탁도는 가장 혼탁한 각막 부위를 측정하고 표 1의 점수에 따라 평가한다. 모든 관찰 시점에서 모든 안구에 대해 각막 혼탁도의 평균 점수를 계산한다. 각 시점에서의 각막 혼탁도의 평균 점수 중 최고값에 따라 시험물질에 대한 ICE 분류를 결정한다.

표 1. 각막 혼탁도 점수

점수	관찰사항
0	혼탁하지 않음
0.5	매우 희미한 혼탁
1	산재하거나 넓은 부위 혼탁, 홍채의 각 부위가 선명하게 보임
2	쉽게 확인할 수 있는 반투명 혼탁, 홍채의 각 부위가 약간 흐릿함
3	심한 각막의 혼탁, 홍채의 특정 부위 확인 불가, 동공 크기 거의 확인 불가
4	각막 전체 혼탁, 홍채 확인 불가

플루오레세인 잔류도는 표 2의 점수에 따라 시험물질 노출 30분 경과 시점에서 각 안구의 플루오레세인 잔류도를 점수화하고, 모든 안구에 대한 평균값을 계산하여 시험물질에 대한 ICE 분류를 결정한다.

표 2. 플루오레세인 잔류도 점수

점수	관찰사항
0	플루오레세인 잔류(염색) 없음
0.5	매우 적은 단일 세포가 염색되어 있음
1	단일 세포 염색이 각막 전체 부위에 산발적으로 있음
2	단일 세포의 염색이 국소적 또는 밀집된 상태로 있음
3	넓은 부위의 각막에 플루오레세인 잔류가 밀집되어 있음

형태학적인 영향은 각막 상피의 "함몰(pitting)", "이완(loosening)", "거칠어짐(roughening)" 및 시험물질이 각막에 "접착(sticking)"하는 정도를 확인하여 판단한다.

조직병리 평가를 실시하는 경우, 표 3의 반(半)정량적(semi-quantitative) 점수 체계를 사용하여 상피층, 기질층, 내피층에 나타나는 영향을 점수화 하고 내부 병리 전문 평가(internal pathology peer review system)를 실시한다.

표 3. 닭 안구에 적용되는 반(半)정량적 조직병리 평가 점수 체계

매개변수	관찰사항	점수	설명
상피층: 미란(부식)	매우 경미함	1/2	단일 표피층 전체의 단일 세포 거의 없음
	경미함	1	최대 3개 층이 소실됨
	보통	2	최대 50%의 상피층이 소실됨
	심각	3	상피층이 기저막까지 내려감
상피층: 공포(액포)화 (상피 상층부, 중간층, 하층부에 대한 개별 점수)	매우 경미함	1/2	단일 또는 소수의 산재된 세포
	경미함	1	공포(액포)화 된 세포군 또는 작은 공포(액포)가 있는 단일 세포열
	보통	2	상피의 최대 50%가 공포(액포)화 된 세포
	심각	3	상피의 50~100%가 공포(액포)화 된 세포
상피층: 괴사	정상	-	괴사세포 < 10개
	매우 경미함	1/2	괴사세포 10~20개
	경미함	1	괴사세포 20~40개
	보통	2	괴사세포가 많지만 상피층의 50% 미만임
	심각	3	상피층의 50~100%가 괴사됨
기질층: 농축핵 (상층부 또는 하층부)	정상	-	농축핵 < 5개
	경미함	1	농축핵 5~10개
	보통	2	농축핵 > 10개
기질층의 섬유 이상	있음	P	섬유의 불규칙한 외형
내피층: 괴사	있음	P	내피는 단일층으로만 구성 되므로 분류와 관련이 없음

조직병리 영향은 슬라이드에 전반적으로 나타나는 영향을 확인하여 평균 점수를 매겨야 한다. 단, 특정 부위에 한정된 국소(focal) 또는 다국소적(multifocal) 영향을 일으키는 시험물질의 경우 조직병리학자에게 알리고, 국소적 부작용에 근거하여 점수화한다. 또한 ICE 결과와 조직병리학적 관찰이 일치하지 않는 경우가 있다면 각막의 다른 부위에서 추가 표본을 준비하여 관찰 단면의 국소적 영향(localized effect)을 확인한다.

4.6 결정 기준

각막 혼탁도(opacity), 각막 종창(swelling), 플루오레세인 잔류도(fluorescein retention) 결과를 개별적으로 평가하여 표 4~6의 분류 기준에 따라 ICE 분류를 정한다. 그리고 표 7의 종합 생체의 분류(*In Vitro Classification*)에 따라 각막 종창, 각막 혼탁도 및 플루오레세인 잔류도의 ICE 분류를 조합하거나 혼탁도 점수 또는 형태학적 영향 평가 결과(심한 상피 이완)를 통해 시험물질의 생체의 분류(*In Vitro Classification*)를 예측한다.

표 4. 각막 종창에 대한 ICE 분류 기준

평균 각막 종창(%)*	ICE 분류
0 ~ 5	I
> 5 ~ 12	II
> 12 ~ 18(< 처리 후 75분)	II
> 12 ~ 18(= 처리 후 75분)	III
> 18 ~ 26	III
> 26 ~ 32(< 처리 후 75분)	III
> 26 ~ 32(= 처리 후 75분)	IV
> 32	IV

참고: * 모든 관찰 시점에서의 최고 평균점수

표 5. 각막 혼탁도에 대한 ICE 분류 기준

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

참고: * 모든 관찰 시점에서의 최고 평균점수(표 1의 혼탁도 점수에 근거). *표 2에 정의된 점수에 근거함.

표 6. 플루오레세인 잔류도에 대한 ICE 분류 기준

처리 30분 후 평균 플루오레세인 잔류도 점수*	ICE 분류
0.0 ~ 0.5	I
0.6 ~ 1.5	II
1.6 ~ 2.5	II
2.6 ~ 3.0	IV

참고: * 표 2에 정의된 점수에 근거함.

표 7. 종합 생체외 분류(*In Vitro* Classification)

UN GHS 분류	3가지 평가항목의 조합
No Category	3 × I
	2 × I, 1 × II
	2 × II, 1 × I
예측 불가	기타 조합
Category 1	3 × IV
	2 × IV, 1 × III
	2 × IV, 1 × II*
	2 × IV, 1 × I*
	30분 시점의 각막 혼탁도 = 3(2개 이상의 안구)
	모든 시점의 각막 혼탁도 = 4(2개 이상의 안구)
	심한 상피 이완(1개 이상의 안구)

참고: * 조합 가능성이 낮음.

UN GHS No Category 결과가 나오는 고체물질(위음성률이 높음)의 경우, 두 번째 시험을 실시하여 음성 결과를 확인하거나 폐기시킨다.

pH가 극단적이지 않은(non-extreme, $2 < \text{pH} < 11.5$) 세정제 및 계면활성제에 대해 조직병리 평가를 실시하는 경우, 표 8의 결정 기준을 사용하여 표 9의 예측모델에 따라 UN GHS Category 1로 판정한다. 또한 3개 중 2개 이상의 안구에서 기질층의 농축핵 점수가 \geq 가벼움(1점)으로 관찰되는 경우 또는 3개 중 2개 이상의 안구에서 내피층의 영향이 관찰되는 경우에는 관찰 결과를 기록한다.

표 8. ICE 시험법과 함께 사용되는 조직병리 평가 결정 기준

조직층	심한 안손상을 유발하는(GHS Category 1) 영향 확인
상피층	<ul style="list-style-type: none"> - 미란(부식) = 보통(2점) : 안구 3개 중 적어도 2개에서 관찰됨 - 밧/또는, 공포(액포)화(= 매우 가벼움, 1/2점) : 안구 3개 중 적어도 2개의 중간 또는 하층부에서 관찰됨 - 또는, 미란(부식) = 보통(2점) : 안구 3개 중 1개에서 관찰됨 + 공포(액포)화 = 매우 가벼움(1/2점) : 안구 3개 중 적어도 하나 이상의 중간 또는 하층부에서 관찰될 경우 - 밧/또는, 괴사 = 보통(2점) : 안구 3개 중 적어도 2개에서 관찰됨

표 9. ICE 조직병리 평가 예측모델

표준 ICE	표 8의 ICE 조직병리 평가	UN GHS 분류
예측 불가	기준 충족	UN GHS Category 1
	기준 미충족	예측 불가

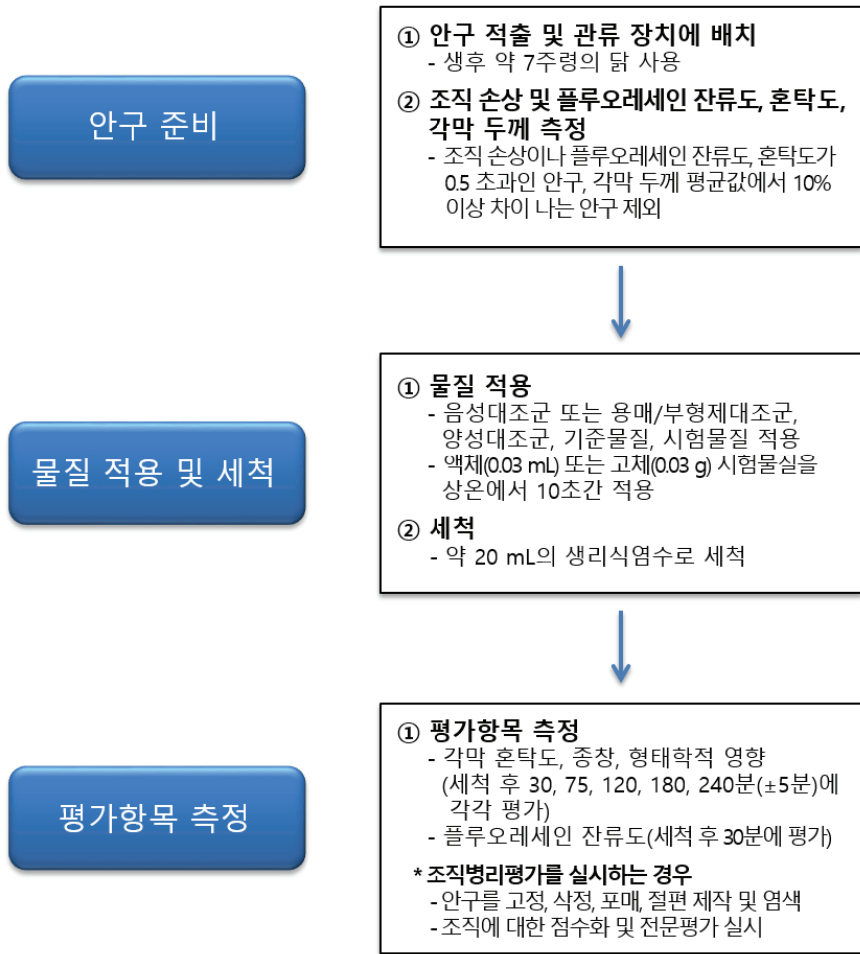


그림 2. 닭의 안구를 이용한 안점막자극 시험법(Isolated Chicken Eye Test) 절차

V 인정요건

시험물질과 함께 동시에 시험된 음성대조군 또는 용매/부형제대조군, 양성대조군이 각각 UN GHS No Category 및 Category 1로 식별되면 시험이 인정되는 것으로 간주된다.

VI 시험결과 및 보고

시험 보고서

시험 보고서는 시험의 수행과 관련된 경우 다음의 정보를 포함해야 한다.

시험물질 및 대조물질

- 화학물질의 정보(IUPAC 또는 CAS 등록명, CAS 등록번호, SMILES 또는 InChI 코드, 구조식, 및 다른 식별자료)
- 가능한 범위에서 시험/대조물질(또는 혼합물)의 순도 및 구성(중량별 백분율)
- 다성분 화합물 및 UVCB: 구성물질의 화학물질 정보(위 참고), 순도, 양적 비율과 적절한 물리화학적 특성(위 참고) 등의 정보(가능한 범위로)
- 물리적 상태, 휘발성, pH, 안정성, 화학적 분류, 물에 대한 용해도, 시험 수행과 관련된 추가적인 물리화학적 특성
- 해당하는 경우 시험 전 처리방법(예: 가운, 분쇄)
- 보관 조건 및 안정성(가능한 범위로)

시험 의뢰기관 및 시험기관 관련 정보

- 시험의뢰기관, 시험기관, 연구책임자의 이름 및 주소, 해당하는 경우 조직병리 전문가도 포함
- 안구 출처 정보(예: 안구 수집 시설)

시험법 조건

- 시험계 설명
- 세극등현미경 및 두께 측정기(예: 모델), 기기 설정

- 과거 음성 및 양성대조군 결과에 대한 참고문헌, 해당하는 경우, 동시 기준 대조군(benchmark control) 허용 범위를 보여주는 과거 데이터
- 시간의 경과에 따른 시험법의 무결성(예: 정확도 및 신뢰도)을 보장하기 위한 절차(예: 정기적인 숙련도물질 시험)
- 조직병리 평가가 시행되는 경우, 조직 고정 절차

안구 수집 및 준비

- 닭의 주령 및 무게, 해당하는 경우 안구가 수집된 닭의 기타 특성(예: 성별, 종)
- 안구의 보관 및 운반 조건(예: 안구 수집 날짜와 시간, 닭 머리 수집 후 관류 챔버에 안구 배치까지의 시간 간격)
- 안구 준비 및 장착(안구의 품질, 안구 챔버 온도 및 시험에 사용되는 선별 기준 등에 대한 기술 포함)

시험 절차

- 반복시험 수
- 음성대조물질 및 양성대조물질 정보(해당하는 경우, 용매 및 기준 대조물질)
- 시험물질 용량, 적용 및 노출 시간
- 관찰 시점(처리 전후)
- 평가 및 결정 기준 설명(해당하는 경우, 조직병리 평가 포함)
- 해당하는 경우, 조직병리학적 관찰에 대한 전문 평가(peer-review) 시스템
- 시험 인정요건에 대한 설명
- 시험 절차의 모든 변경사항에 대한 설명
- 또한 표준작업지침서(SOP) 등에 포함되지 않는 경우 가능하면 다음의 정보를 포함해야 한다.

- 통합 교육 및 전수 가능성 설명
- 고정제, 탈수제, 정화제 및 프로토콜
- 포매에 사용한 재료, 침투용매(infiltration solvent) 및 농도
- 조직 단면 두께
- 염색(보고서) 및 관련 염색 프로토콜
- 장비 정보

결과

- 각각의 안구에 대한 각 관찰 시점의 각막 종창 및 혼탁도, 플루오레세인 잔류도 점수의 표(tabulation)(각 관찰시점의 모든 안구에 대한 평균 점수 포함)
- 관찰된 모든 형태학적 영향 설명
- 모든 시점에서 각막 종창, 혼탁도, 플루오레세인 잔류도 점수의 평균 점수의 최고값, 해당 ICE 분류
- 해당하는 경우, 조직병리 반-정량적 점수 관찰 표 및 도출된 결론
- 해당하는 경우, 조직병리 평가 점수에 국소적 영향의 반영에 대한 표시
- 관찰된 모든 기타 영향 설명
- 도출된 생체외(*in vitro*) GHS 분류
- 해당하는 경우, 처리군 및 대조군의 안구 사진
- 해당하는 경우, 조직병리 표본의 디지털 이미지 또는 디지털 슬라이드 스캔 (선택사항)

결과 고찰

결론

별첨 1 번역본(OECD TG 438)

닭의 안구를 이용한 안점막자극 시험법(ICE) Isolated Chicken Eye Test Method

개요

1. 적출된 닭의 안구(Isolated Chicken Eye, ICE)를 이용한 안점막자극 시험법은 2006년과 2010년에 미국동물대체시험법 검증센터(Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, ICCVAM), 유럽동물대체시험법검증센터(European Centre for the Validation of Alternative Methods, ECVAM), 일본동물대체시험법검증센터(Japanese Centre for the Validation of Alternative Methods, JaCVAM)에 의해 공동으로 평가되었다⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾. ICE 시험법은 원래의 평가에서 UN 화학물질 분류 및 표시에 관한 「국제조화시스템(United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, UN GHS)」에 규정된 ‘심한 안손상을 유발하는 화학물질(물질 및 혼합물)(Category 1)’을 식별하기 위한 스크리닝 시험(screening test)으로 사용하기에 과학적으로 타당한 시험법으로 승인되었다⁽¹⁾⁽²⁾⁽⁴⁾. 또한 검증 연구에 사용된 생체외(*in vitro*) 및 생체내(*in vivo*) 데이터에 대한 재평가에서 UN GHS에 규정된 ‘안자극 및 심한 안손상에 대한 분류가 필요하지 않은 화학물질’을 식별하기 위해서도 ICE 시험법이 사용될 수 있다고 결론 내렸고, 이에 따라 2013년에 채택된 TG 438이 개정 되었다⁽⁴⁾⁽⁵⁾. 이후 UN GHS 분류체계에 따라 분류가 필요하지 않은 화학물질의 식별을 위해 사용하는 판정 기준(Decision Criteria)이 최근의 허용기준(acceptance standards)에 근거하여 개정되었다⁽⁵⁾⁽⁶⁾⁽⁷⁾⁽⁸⁾. 아울러 조직병리(histopathology)가 UN GHS Category 1 pH가 극단적이지 않은(non-extreme, $2 < \text{pH} < 11.5$) 세정제 및 계면활성제를 식별하는 유용한 추가 평가항목인 것으로 확인되었다⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾. 본 시험 가이드라인(2009년 채택, 2013년 및 2018년 개정)은 이러한 평가들을 바탕으로 ICE 시험법의 최근 권장된 사용 사항과 제한점을 포함한다.

2. 가까운 시일 내에, 다양한 화학물질군의 모든 안자극 범위 전체를 예측하는 생체내(*in vivo*) Draize 안자극 시험을 단일 생체외(*in vitro*) 안자극 시험이 완전히 대체할 수 없다는 것이 일반적인 견해이다. 그러나 단계적(tiered) 시험전략 및/또는 통합독성평가(Integrated Approaches to Testing and Assessment, IATA) 내에서 대체시험법을 전략적으로 조합하는 경우, 생체내(*in vivo*) Draize 안자극 시험을 대체하는 것이 가능할 수 있다⁽⁷⁾⁽¹¹⁾. 하향식 접근방식(Top-Down approach)은 기존 정보에 근거하여 시험물질이 심한 안손상을 유발할 것으로 예상되는 경우에 사용하도록 설계되는 반면, 상향식 접근방식(Bottom-Up approach)은 시험물질이 안자극을 유발하지 않을 것으로 예상되는 경우, 사용하도록 설계된다⁽⁷⁾⁽¹¹⁾. ICE 시험법은 7~11항에서 기술된 대로 화학물질의 안(眼) 유해성 분류 및 표시에 관해서 특정 상황에 일부 제한점을 가지고 사용할 수 있는 생체외(*in vitro*) 시험법이다. ICE 시험법은 생체내(*in vivo*) 토끼 안자극 시험에 대한 단독 대체시험법으로 간주되지는 않지만, 추가시험 없이 심한 안손상을 유발하는 화학물질 즉, UN GHS Category 1 물질을 식별하기 위해 OECD GD 263⁽⁷⁾에서 권장하는 하향식 접근방식(Top-Down approach)과 같은 시험전략 내에서 첫 번째 단계의 시험법으로 권장된다⁽⁴⁾. 또한 ICE 시험법은 UN GHS에서 정의된 대로 안자극 또는 심한 안손상에 대한 분류가 필요하지 않은 화학물질(No Category)⁽⁴⁾ 식별에 권장되며 상향식(Bottom-Up) 시험전략 접근방식의 초기 단계로 사용할 수 있다(OECD GD 263)⁽⁷⁾. 그러나 ICE 시험법에서 심한 안손상을 유발하는 것으로 예측되지 않는 화학물질이거나 안자극 또는 심한 안손상에 대한 분류가 필요하지 않는 것으로 예측되지 않는 화학물질인 경우 확정적인 분류를 위해서는 추가 정보가 필요하다. 가장 적절한 시험법의 선택과 본 시험 가이드라인의 사용은 심한 안손상 및 안자극 통합독성평가(IATA)에 대한 OECD 지침서의 문맥 내에서 고려되어야 한다⁽⁷⁾. 아울러 UN GHS 이외에 다른 분류 체계에 대한 상향식 접근방식(Bottom-Up approach)에서 ICE 시험법을 사용하는 경우 사전에 관련 규제 당국과 협의해야 한다.

3. 본 시험 가이드라인의 목적은 적출된 닭 안구에서 시험물질의 독성 유발 여부를 측정하여 해당 물질의 안 유해 가능성(eye hazard potential)을 평가하기 위한 절차를 기술하는 것이다. 각막에 대한 독성은 (i) 혼탁도의 정성적 평가, (ii) 플루오레세인

투여에 따른 각막 상피 손상의 정성적 평가(플루오레세인 잔류도), (iii) 두께 증가(종창)의 정량적 측정, (iv) 시험물질을 처리한 안구 표면의 형태학적 손상에 대한 정성적 육안 평가로 측정된다. 시험물질 노출 후의 각막혼탁, 종창 및 손상을 개별적으로 평가한 후 이를 종합하여 안자극 분류(Eye Irritancy Classification)를 판정한다. 아울러 UN GHS Category 1 pH가 극단적이지 않은(non-extreme, $2 < \text{pH} < 11.5$) 세정제 및 계면활성제에 대한 예측력을 잠재적으로 향상 시키기 위해 추가 평가항목으로 조직병리학적 관찰을 사용할 수 있다(8항 및 56항 참고).

4. 용어 정의는 부록 1에 수록되어 있다.

초기 고려사항 및 제한점

5. 본 시험 가이드라인은 OECD 지침서 160⁽¹²⁾(2011년 채택, 2017년과 2018년 개정)에서 제시된 프로토콜을 기반으로 하며 기존에 발간된 프로토콜⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾의 내용에 근거한다.

6. 본 시험 가이드라인의 기반이 되는 평가에서 광범위한 화학물질이 시험되었으며, 현재의 전체 데이터베이스는 75개 단일물질과 109개 혼합물로 이루어진 총 184개 시험물질에 달한다⁽⁵⁾. 본 시험 가이드라인은 고체, 액체, 에멀전 및 젤의 형태에 적용될 수 있으며, 액체는 수용성이거나 비수용성, 고체는 물에 수용성 또는 불수용성일 수 있다. 기체와 에어로졸은 검증 연구에서 평가되지 않았다.

7. ICE 시험법은 심한 안손상을 유발하는 화학물질인 UN GHS Category 1 물질을 식별하는 데 사용될 수 있다⁽⁴⁾. 이러한 목적으로 사용되는 경우, ICE 시험법에서 확인된 제한점은 알코올에 대한 높은 위양성률과 고체/계면활성제에 대한 높은 위음성률에 의한 것이다⁽¹⁾⁽³⁾⁽¹⁸⁾. 더욱이 생체내(*in vivo*)에서 과도하지 않은 영향(non severe effects)을 지속적으로 일으키는 시험물질은 과소예측(under-prediction)이 되는 위험성을 가진다⁽²²⁾. 그러나 이러한(UN GHS Category 1을 UN GHS Category 1이 아닌 것으로 식별) 위음성률은 별로 중요하지 않다. 그 이유는 음성으로 나온 화학물질의

경우 추후 규제 요건에 따라서 증거의 가중치(weight-of-evidence) 접근방식의 순차적인 시험전략을 사용하여, 충분히 검증된 다른 생체외(*in vitro*) 시험법 또는 마지막 옵션으로 토끼를 이용하여 평가되기 때문이다. 또한 생체내(*in vivo*)에서 주로 과도하지 않은 영향을 지속적으로 유발하는 UN GHS Category 1 pH가 극단적이지 않은(non-extreme, $2 < \text{pH} < 11.5$) 세정제(및 계면활성제⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾⁽¹⁹⁾)를 식별하는데 있어서 조직병리 평가는 위음성률을 줄이는데 유용한 추가 평가항목으로 확인되었다. 고체물질의 경우 생체내(*in vivo*) Draize 안자극 시험에서 가변적(variable)이고 극단적인 노출 양상을 초래할 수 있으며, 이로 인해 실제 자극 가능성(potential)과 무관한 예측이 나올 수 있다⁽²⁰⁾. 연구자는 모든 유형의 화학물질에 대해 본 시험법의 적용을 고려할 수 있으며 이때 양성 결과는 추가시험 없이 UN GHS Category 1에 해당되는 심한 안손상의 표시로서 받아들여질 수 있다. 하지만, 알코올에서 얻어진 양성 결과는 과대예측(over-prediction)의 위험성이 있으므로 신중하게 해석되어야 한다.

8. 심한 안손상을 일으키는 화학물질(UN GHS Category 1)의 식별에 사용하는 경우, UN GHS 분류체계에 따라 생체내(*in vivo*) 토끼 안자극 시험 데이터와 비교할 때 ICE 시험법(조직병리 평가 없이)의 정확도는 83%(142/172), 위양성률은 7%(9/127), 위음성률은 47%(21/45)로 나타났다⁽⁴⁾⁽⁵⁾. 조직병리 평가가 UN GHS Category 1 pH가 극단적이지 않은(non-extreme, $2 < \text{pH} < 11.5$) 세정제 및 계면활성제를 식별하는 추가 평가항목으로 간주되는 경우, ICE 시험법의 위음성률은 64%에서 27%(n=22), 정확도는 53%에서 77%(n=30)로 개선되며, 위양성률은 유지된다(0~12.5%(n=8))⁽¹⁰⁾.

9. ICE 시험법은 UN GHS 분류체계에 있어 안자극 또는 심한 안손상에 대한 분류가 필요하지 않은 화학물질의 식별에도 사용될 수 있다⁽⁴⁾. 본 시험법은 모든 유형의 화학물질에 적용할 수 있으며, 이때 음성 결과는 안자극 및 심한 안손상에 대한 분류가 필요하지 않은 것으로 간주할 수 있다. 하지만 검증 데이터베이스의 결과에 따르면 오염방지 유기용매를 함유하는 페인트는 과소예측 될 수 있다⁽⁵⁾.

10. 안자극 및 심한 안손상에 대한 분류가 필요하지 않은 화학물질(UN GHS No Category) 식별에 사용하는 경우, UN GHS 분류체계에 따라 생체내(*in vivo*) 토끼 안자극 시험 데이터와 비교할 때 ICE 시험법의 정확도는 88%(161/184), 위양성률은 24%(20/83), 위음성률은 3%(3/101)이다⁽⁴⁾⁽⁵⁾. 특정 분류의 시험물질(예: 오염방지 유기용매 함유 페인트 등)을 데이터베이스에서 제외할 경우, ICE 시험법의 UN GHS 분류체계에 대한 정확도는 88%(159/181), 위양성률은 24%(20/83), 위음성률은 2%(2/99)이다⁽⁴⁾.

11. ICE 시험법은 안자극으로 분류된 화학물질(즉, UN GHS Category 2 또는 2A), 또는 약한 안자극으로 분류된 화학물질(UN GHS Category 2B)을 식별하는 방법으로 권장하지 않는다. 그 이유는 상당수의 UN GHS Category 1 화학물질이 UN GHS Category 2/2A 또는 2B로 과소 분류되고, UN GHS No Category가 UN GHS Category 2/2A 또는 2B로 과대 분류되기 때문이다. 이러한 목적으로는 추가적인 정보와 경우에 따라서 다른 적절한 시험법으로 추가시험이 필요할 수 있다.

12. 닭의 안구를 이용하여 진행되는 모든 절차는 인체 또는 동물 유래 물질(조직 및 조직액을 포함하며 이에 국한되지 않음)의 취급에 대한 해당 지역의 규정 및 시험 실시기관의 절차를 준수해야 한다. 일반적인 실험실 주의사항의 준수를 권장한다⁽²¹⁾.

13. ICE 시험법은 생체내(*in vivo*) 토끼 안자극 시험에서 평가하는 결막 및 홍채 손상을 직접적으로 다루지 않는 반면 UN GHS 분류를 고려할 때 생체내(*in vivo*) 분류의 주요 근거가 되는 각막 영향을 다룬다. 이러한 점에서 홍채에 미치는 영향이 UN GHS⁽⁸⁾⁽²²⁾에 따른 화학물질 분류에 다소 중요도가 낮은 것이 주목된다. ICE 시험법에서 각막 손상의 가역성 그 자체를 평가할 수 없지만, 조직병리학적 관찰은 pH가 극단적이지 않은(non-extreme, $2 < \text{pH} < 11.5$) 세정제로 유발되는 경우와 같이 초기에 나타나는 심한 손상과는 연관되지 않은 비가역적 영향을 유발하는 시험물질을 식별하는 데 도움이 될 수 있다⁽⁹⁾. 또한 ICE 시험법으로는 안구 노출과 연관된 전신 독성의 가능성을 평가할 수 없다.

14. 본 시험 가이드라인은 새로운 정보와 데이터를 고려하여 주기적으로 개정될 것이다. 예를 들어, pH가 극단적이지 않은(non-extreme) 세정제 및 계면활성제 이외의 시험물질에 대한 추가적인 조직병리 평가 데이터가 추후 제공 되어질 수 있다. 이를 위해 안구를 보존하고 조직병리 평가 표본을 준비하는 것을 권장하며 이는 본 시험법의 정확도를 보다 향상 시킬 수 있는 결정 기준(decision criteria)과 데이터베이스를 개발하는 데 활용될 수 있다. OECD는 생체외(*in vitro*) 안구 독성시험법으로 ICE 및 BCOP를 사용할 때 참고할 수 있는 지침서(Guidance Document) 160을 마련하였으며, 여기에는 평가를 위한 조직병리 표본 수집 및 처리(*processing*)에 대한 상세한 절차가 포함되어 있다⁽¹²⁾.

속련도 확인

15. 표준 ICE 시험법을 처음으로 도입하려는 실험실에서는 규제적 유해성 분류(regulatory hazard classification)를 목적으로 ICE 데이터를 제출하기 전에 부록 2에 제시된 속련도 물질을 사용하여 ICE 표준 시험법 수행에 대한 기술적 역량을 입증해야 한다. pH가 극단적이지 않은(non-extreme) 세정제 및 계면활성제의 규제적 유해성 분류를 위해 ICE 시험법의 조직병리 평가를 확립하고자 하는 실험실에서는 개정된 OECD GD 160에 나와 있는 ICE Atlas 및 권장사항을 따라야 한다⁽¹²⁾. 표준화된 조직병리 평가가 일관적이고 재현성 있게 이루어지기 위해 체계적으로 통합된 교육, 시험법의 전수 및 속련도 평가가 권장된다. 나아가 최근 권고사항⁽²³⁾ 및 조직병리의 전문 평가(peer review of histopathology)를 위한 GLP 요건의 OECD 자문 보고서 16번 및 50항에 기술된 바에 따라 내부 병리 전문 평가(peer review)⁽²⁴⁾를 실시해야 한다. 이러한 전문 평가를 통해 병리학적 진단 및 해석의 수준과 정확도를 검증하고 향상 시킬 수 있다. 실험실은 pH가 극단적이지 않은(non-extreme) 세정제 및 계면활성제의 규제적 유해성 분류를 위한 ICE 시험법의 조직병리 평가 데이터를 제출하기 전에, 부록 3의 속련도 화학물질을 사용하여 조직병리 평가 결과(점수화)의 기술적 역량을 입증해야 한다.

시험 원리

16. ICE 시험법은 생체외(*in vitro*)에서 닭의 안구를 단기간 유지하여 제공하는 기관 모델(organotypic model)이다. 본 시험법에서 시험물질에 의한 손상은 각막 종창, 혼탁도, 플루오레세인 잔류도의 판정을 통해 평가된다. 아울러 UN GHS Category 1 pH가 극단적이지 않은(non-extreme, $2 < \text{pH} < 11.5$) 세정제 및 계면활성제 식별의 민감도(sensitivity)를 높이기 위해 조직병리 평가가 사용될 수 있다⁽¹⁰⁾. 각막 종창 측정은 정량적 평가를 제공하는 반면, 각막 혼탁도, 플루오레세인 잔류도 및 조직병리학적 변화는 정성적 평가로 이루어진다. 각 측정값은 ICE 분류(I~IV)를 정하는데 사용되는 정량적 점수로 변환하거나 정성적으로 범주화하여 생체외(*in vitro*) 안 유해성을 분류(UN GHS Category 1 또는 UN GHS No Category)하는데 사용된다(판정기준 참조). 단, UN GHS Category 1 또는 UN GHS No Category에 해당되지 않는 물질은 ICE 시험법으로 예측될 수 없다(11항 참조). 이 경우, ICE 시험법의 "예측 불가(No prediction can be made)" 라는 결과는 분류의 목적을 위해 추가 정보를 필요로 한다[지침서⁽⁷⁾ 참조].

닭 안구의 공급과 주령

17. 본 시험법은 식용으로 도축된 도계장 닭으로부터 수집된 안구를 사용하므로, 실험동물을 필요로 하지 않는다. 식용으로 적합하다고 간주되는 건강한 닭의 안구만을 사용한다.

18. 최적의 주령을 평가하는 연구는 따로 진행되지 않았지만, 이전부터 이 시험에 사용된 닭의 주령과 무게는 가금류 도계장에서 주로 취급하는 영계에 해당한다(즉, 생후 약 7주령, 1.5~2.5 kg).

수집 및 실험실로의 운반

19. 닭을 인도적인 기절법과 목의 절개를 통해 도축하고 머리를 즉시 제거한다. 닭 안구의 품질에 부정적 영향을 미치지 않는 한, 인도적인 기절방법은 전격법(electrical stunning)과 가스조절법(controlled atmosphere stunning)이 포함된다(21항 참조). 닭의 머리를 도계장에서 실험실로 신속하게 운송하여 변질 또는 세균 오염을 최소화 하도록 닭의 공급처는 실험실에서 가까워야 한다. 시험법의 인정요건을 충족하기 위해서 닭 머리 수집부터 안구 적출 후 관류 챔버(superfusion chamber)에 안구를 넣을 때까지 걸리는 시간을 최소화 해야한다(일반적으로 2시간 이내). 시험에 사용되는 모든 닭 안구는 특정일에 같은 그룹 내에서 수집되어야 한다.

20. 안구는 실험실에서 적출되므로, 도계장으로부터 온전한 상태의 머리를 상온(일반적으로 18~25℃)에서 생리식염수(등장성 식염수)를 적신 티슈로 수분이 유지된 플라스틱 상자에 담아 운반한다.

ICE 시험법에 사용되는 안구의 선별 기준 및 수

21. 적출 후 기준 플루오레세인 잔류도가 높거나(> 0.5) 각막 혼탁도 점수가 높은(> 0.5) 안구는 제외한다.

22. 각 시험물질처리군 및 양성대조군은 최소 3개의 안구를 사용하고, 음성대조군 또는 용매대조군(생리식염수 이외의 용매를 사용하는 경우)은 최소 1개의 안구를 사용한다.

23. GHS No Category 결과가 나오는 고체물질의 경우, 3개의 안구로 두 번째 시험을 실시하여 음성 결과를 확인(confirm) 또는 무시(discard) 하는 것을 권장한다.

시험 절차

안구 준비

24. 각막이 손상되지 않도록 주의하며 눈꺼풀을 조심스럽게 잘라낸다. 2%(w/v) 플루오레세인나트륨(sodium fluorescein) 한 방울을 각막 표면에 떨어뜨리고 몇초 후 생리식염수로 씻어내어 각막의 온전함(integrity)을 신속하게 평가한다. 각막의 손상 여부를 확인하기 위해 플루오레세인을 처리한 안구를 세극등현미경(slit-lamp microscope)으로 관찰한다(플루오레세인 잔류도 및 각막 혼탁도 점수 ≤ 0.5).

25. 각막이 손상되지 않도록 주의하며 두개골에서 안구를 분리한다. 외과용 집게로 깜박임막(nictitating membrane)을 단단하게 잡고 안와(orbit)에서 안구를 잡아당겨 끝이 뭉툭하고 휘어진 가위로 눈 근육을 잘라낸다. 너무 강한 압력으로 인해 각막이 손상되지 않도록 주의한다.

26. 안와에서 안구를 적출할 때 시신경 일부가 눈에 보이게 남아 있어야 한다. 안구를 안와에서 적출한 후 흡수패드에 올려놓고 깜박임막과 다른 결합조직을 제거한다.

27. 적출된 안구를 클램프(스테인리스스틸 또는 적절한 다른 소재)에 수직으로 올려놓고, 클램프에 의해 안구에 과도한 압력이 가해지지 않도록 한다(닭 안구의 공막은 비교적 단단하기 때문에 닭 안구를 고정시킬 때는 약간의 압력으로 충분함). 그 다음 클램프를 관류장치 챔버로 옮긴다⁽²⁵⁾. 클램프는 관류 장치 안에 놓여서 각막 전체에 생리식염수(3~4방울/분 또는 0.1~0.15 mL/분)가 공급되도록 한다. 관류장치 챔버의 온도는 $32 \pm 1.5^\circ\text{C}$ 로 유지해야 한다. 부록 4(Annex 4)는 일반적인 관류장치 및 안구 클램프의 모식도를 보여주며 관류장치와 클램프는 구매하거나 제작할 수 있다. 관류장치는 각 실험실의 필요(예: 수용가능 안구 수)에 따라 변형할 수 있다.

28. 안구를 관류장치에 배치한 후 다시 세극등현미경(예: Haag-Streit BP900)으로 관찰하여 해부 과정에서 손상되지 않았는지 확인한다. 또한 이때 세극등현미경에 장착된 두께 측정기(depth measuring device)로 각막 꼭지점에서 각막 두께를

측정한다. 안구가 (i) 플루오레세인 잔류도 값 > 0.5 , (ii) 각막 혼탁도 > 0.5 인 경우 또는 (iii) 기타 손상 징후가 있는 경우 교체해야 한다. 이 기준에는 부합하지만 각막 두께가 시험에 사용되는 모든 안구의 평균값에서 10% 이상 차이가 나는 안구는 제외시킨다. 두께 측정기 no. 1이 장착된 Haag-Streit 세극등 BP900의 경우, 세극 폭 조정 (slit-wide setting)이 0.095 mm에 해당하는 $9\frac{1}{2}$ 이 되도록 한다. 또한 두께 측정기가 장착되고 세극 폭을 0.095로 적용하는 경우, Haag-Streit 세극등 BQ900도 사용할 수 있다(53항 참조). 사용자들은 세극 폭 셋팅이 달라지면 세극등현미경의 각막 두께 측정값이 달라질 수 있다는 것을 알아야 한다.

29. 모든 안구를 검사하고 사용 가능하다고 판단되면, 안구는 시험물질 적용 전 시험계와 평형을 이루기 위해 약 45~60분 동안 안구를 배양한다. 평형이 이루어진 후에는 기준(baseline)이 되는 각막 두께와 혼탁에 대한 제로(0) 참고 측정값(zero reference measurement)을 기록한다(예: 시간0). 안구 준비 단계(at dissection)에서 측정한 플루오레세인 점수가 해당 평가항목(플루오레세인 잔류도)의 기준값으로 사용된다.

시험물질 적용

30. 제로(0) 참고 측정값을 확인한 후 바로 안구(홀더로 고정)를 관류장치에서 꺼내 수평으로 놓고 시험물질을 각막에 적용한다.

31. 액체 시험물질은 일반적으로 희석하지 않고 사용하며, 필요한 경우(예: 실험 계획의 일부) 희석할 수 있다. 시험물질 희석에 선호되는 용매는 생리식염수이다. 이외 다른 용매가 특정 조건 하에(under controlled conditions) 사용될 수 있으나, 사용에 대한 적정성(appropriateness)이 입증되어야 한다.

32. 액체 시험물질은 각막 표면 전체를 고르게 덮도록 적용한다; 표준량(standard volume)은 0.03 mL이다.

33. 고체 시험물질은 막자사발 또는 이와 유사한 분쇄 도구를 이용하여 가능한 곱게 갈아야 한다. 분말은 각막 표면을 균일하게 덮도록 적용한다; 표준량은 0.03 g이다.

34. 상온에서 시험물질(액체 또는 고체)을 10초간 적용하고 생리식염수(약 20 mL)로 안구를 씻어낸다. 이후 안구(홀더로 고정)를 처음과 같이 똑바로 세워 관류장치에 수직으로 놓는다. 필요한 경우, 각막에서 시험물질 잔여물이 발견되면 추가 세척 과정을 진행한다. 일반적으로 추가 세척에 사용되는 생리식염수의 양은 중요하지 않으며, 각막에 시험물질이 남아 있는지 관찰하는 것이 중요하다.

대조물질

35. 매 시험마다 동시 음성대조군 또는 용매/부형제대조군, 양성대조군을 포함시켜야 한다.

36. 액체 원액 또는 고체로 시험을 진행할 때, 시험계의 비특이적 변화를 감지하고 시험조건으로 인해 적절하지 않은 자극 반응을 유발하지 않는지를 확인하기 위하여 생리식염수(등장성)를 동시 음성대조군으로 사용한다.

37. 희석액으로 시험을 진행할 때는 시험계의 비특이적 변화를 감지하고 시험조건으로 인하여 적절하지 않은 자극 반응을 유발하지 않는지를 확인하기 위하여 동시 용매/부형제 대조군을 포함시킨다. 31항에 기술된 바와 같이, 시험계에 영향을 주지 않는 것으로 입증된 용매/부형제만 사용할 수 있다.

38. 매 시험마다 적절하게 반응이 유발되는 것을 확인하기 위해 잘 알려진 안자극물질을 동시 양성대조군으로 포함시킨다. 본 시험 가이드라인은 심한 안손상을 유발하는 화학물질을 식별하기 위해 ICE 시험법을 사용하므로, 양성대조군은 UN GHS Category 1 분류기준을 충족하는 반응을 유도하는 참고물질(reference chemical)이어야 한다. 그러나 시간 경과에 따른 양성대조군 반응 변화를 평가하기 위해, 강한 자극 반응의 정도가 과도하지 않아야 한다. 양성대조군에 대한 생체외(*in vitro*) 데이터가 충분히

생성되어 있어서 통계적으로 미리 정해진 양성대조군의 허용범위를 계산할 수 있어야 한다. 만약 특정 양성대조군에 대한 기존 데이터가 충분하지 않은 경우, 이러한 정보를 얻기 위한 연구가 필요할 수 있다.

39. 액체 시험물질에 대한 양성대조물질(예시)은 10% 아세트산(acetic acid) 또는 5% 염화벤잘코늄(benzalkonium chloride)이 있으며, 고체 시험물질에 대한 양성대조물질은 수산화나트륨(sodium hydroxide) 또는 이미다졸(imidazole)이 있다.

40. 기준물질(benchmark chemical)은 특정 화학물질 또는 제품군의 알려지지 않은 화학물질의 안자극 가능성을 평가하거나 자극 반응의 특정 범위 내에서 안자극의 상대적인 자극 가능성을 평가하는 데 유용할 수 있다.

평가항목 측정

41. 시험물질이 처리된 각막은 처리 전과 처리 후 세척한지 30, 75, 120, 180, 240분(±5분)이 경과 시점에서 각각 평가한다. 이러한 측정 시점들은 4시간의 관찰기간 동안 충분한 측정 횟수를 제공하며, 모든 안구에 이루어지는 필수적인 관찰(requisite observation)에 있어 측정 시점 사이에 충분한 간격을 두게 한다.

42. 평가항목은 각막 혼탁도(opacity), 각막 종창(swelling), 플루오레세인 잔류도(fluorescein retention), 형태학적 영향(morphological effect)(예: 상피 함몰 또는 이완)이다. 플루오레세인 잔류도(처리 전, 시험물질 노출 30분 후에만 측정)를 제외한 모든 평가항목은 위에서 언급한 시점에서 측정한다.

43. 각막 혼탁도, 플루오레세인 잔류도, 형태학적 영향 및 조직병리 평가(수행하는 경우)를 문서화하기 위해서 사진을 찍는 것이 권장된다.

44. 4시간째에 마지막 측정을 실시한 후에 특히 pH가 극단적이지 않은(non-extreme, $2 < \text{pH} < 11.5$) 세정제 및 계면활성제에 대한 향후의 조직병리 평가를 위해 적절한

고정액(예: 중성 완충 포르말린)에 안구를 보관하는 것이 권장된다(7항, 14항, 56항 참조). 조직병리 평가를 실시하는 경우, 안구 고정, 삭정(trimming), 파라핀 왁스에 포매(embedding), 절편제작 및 염색은 OECD GD 160의 조직병리 표본 수집 및 처리에 관한 절차에 따라야 한다⁽¹²⁾.

45. 각막 종창은 세극등현미경의 두께 측정기로 각막 두께를 측정하여 확인한다. 각막 종창은 백분율로 나타내며 다음의 공식에 따라 각막 두께 측정값으로 계산한다.

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

46. 모든 관찰 시점에서 모든 안구에 대한 각막 종창의 평균 백분율을 계산한다. 모든 시점에서 각막 종창의 최고 평균 점수에 근거하여 각각의 시험물질에 대한 ICE 분류를 결정한다(53항 참조).

47. 각막 혼탁도는 가장 혼탁한 각막 부위를 측정하고 표 1의 점수에 따라 평가한다. 모든 관찰 시점에서 모든 안구에 대해 평균 각막 혼탁도를 계산한다. 각막 혼탁도의 최고 평균 점수를 기반으로 각각의 시험물질에 대한 ICE 분류를 결정한다(53항 참조).

표 1. 각막 혼탁도 점수

점수	관찰사항
0	혼탁하지 않음
0.5	매우 희미한 혼탁
1	산재하거나 넓은 부위 혼탁, 홍채의 각 부위가 선명하게 보임
2	쉽게 확인할 수 있는 반투명 혼탁, 홍채의 각 부위가 약간 흐릿함
3	심한 각막의 혼탁, 홍채의 특정 부위 확인 불가, 동공 크기 거의 확인 불가
4	각막 전체 혼탁, 홍채 확인 불가

48. 플루오레세인 잔류도는 시험물질 노출 30분 경과 시점에 관찰한 결과로 표 2의 점수에 따라 평가한다. 30분 관찰 시점에서 모든 안구에 대한 평균 플루오레세인 잔류도를 계산하고, 각 시험물질에 대한 ICE 분류를 결정한다(53항 참조).

표 2. 플루오레세인 잔류도 점수

점수	관찰사항
0	플루오레세인 잔류(염색) 없음
0.5	매우 적은 단일 세포가 염색되어 있음
1	단일 세포 염색이 각막 전체 부위에 산발적으로 있음
2	단일 세포의 염색이 국소적 또는 밀집된 상태로 있음
3	넓은 부위의 각막에 플루오레세인 잔류가 밀집되어 있음

49. 형태학적인 영향에는 각막 상피의 "함몰(pitting)", 상피의 "이완(loosening)", 각막 표면의 "거칠어짐(roughening)", 시험물질이 각막에 "접착(sticking)" 정도가 포함된다. 이러한 결과는 심한 정도(severity)가 다양할 수 있고 동시에 같이 나타날 수 있다. 이러한 결과의 분류는 시험자의 해석에 따라 주관적이다.

50. 조직병리 평가를 실시하는 경우, 표 3의 반(半)정량적(semi-quantitative) 점수 체계를 사용해야 한다. 시험물질 처리와 관련된 영향은 조직병리학적 왜곡 결과(histological artefact) 또는 기본적인 형태(background morphology)와 구별하는 것이 중요하다(예: 상피 공포(액포) 영향(epithelial vacuolation effects)). 이를 위해서는 OECD GD 160의 부록 2에 있는 Atlas를 주의깊게 참고해야 한다⁽¹²⁾. 또한 일부 영향은 조직의 3차원 평가가 필요하므로(현미경 사진보다는) 원래의 슬라이드를 사용해야 한다. 관찰된 영향만 점수화 하며, 어떠한 추정도 이루어져서는 안 된다(예: 상피의 상층부가 없어진 경우, 해당 층의 공포(액포)화에 대해서 점수화 할 수 없음). 더욱이 조직 구조(tissue architecture)가 보존된 경우에는 각막 윤부(limbus) 주변의 영향/변화에 대해 점수화 해야 한다. 하지만 각막 윤부 내에서 발생하는 영향/변화는 화학적 노출과 관련되지 않은 것으로 점수화 하지 말아야 한다. 현재 권고안⁽²³⁾ 및 조직병리 전문 평가에 대한 GLP 요건의 OECD 자문 보고서 16에 따라 내부 병리 전문 평가(internal pathology peer review system)를 실시 해야 한다⁽²⁴⁾. 이 과정에서 병리학자(평가하는 조직에 대한 전문지식을 갖춘 자)는 연구에 참여한 병리학자의 병리학적 진단 및 해석을 지원하기 위해 다수의 슬라이드 및 병리학 데이터(예: 안구 3개 중 1개)를 전문 평가한다. 이러한 전문 평가 과정은 병리학적 진단 및 해석의 수준과 정확도를 검증하고 이를 향상 시킨다. 또한 일관된 조직병리학적 관찰을 위해 통합적인 교육, 전수 및 숙련도 평가를 권장한다.

표 3. 고정, 삭정, 파라핀왁스에 포매, 절편제작 및 염색한 적출된 닭 안구에 적용되는 반(半)정량적 조직병리 평가 점수 체계

매개변수	관찰사항	점수	설명*
상피층: 미란(부식)	매우 경미함	1/2	단일 표피층 전체의 단일 세포 거의 없음
	경미함	1	최대 3개 층이 소실됨
	보통	2	최대 50%의 상피층이 소실됨
	심각	3	상피층이 기저막까지 내려감
상피층: 공포(액포)화 (상피 상층부, 중간층, 하층부에 대한 개별 점수)	매우 경미함	1/2	단일 또는 소수의 산재된 세포
	경미함	1	공포(액포)화 된 세포군 또는 작은 공포(액포)가 있는 단일 세포열
	보통	2	상피의 최대 50%가 공포(액포)화 된 세포
	심각	3	상피의 50~100%가 공포(액포)화 된 세포
상피층: 괴사	정상	-	괴사세포 < 10개
	매우 경미함	1/2	괴사세포 10~20개
	경미함	1	괴사세포 20~40개
	보통	2	괴사세포가 많지만 상피층의 50% 미만임
	심각	3	상피층의 50~100%가 괴사됨
기질층: 농축핵 (상층부 또는 하층부)	정상	-	농축핵 < 5개
	경미함	1	농축핵 5~10개
	보통	2	농축핵 > 10개
기질층의 섬유 이상	있음	P	섬유의 불규칙한 외형
내피층: 괴사	있음	P	내피는 단일층으로만 구성 되므로 분류와 관련이 없음

참고: OECD GD 160⁽¹²⁾의 부록 2에 있는 Atlas는 시험물질을 처리하지 않는 닭 안구뿐만 아니라 위에서 설명한 다양한 조직병리학적 영향을 보여주는 시험물질이 처리된 닭 안구의 일반 현미경 사진을 함께 담고 있다.

* 전체 각막에 걸쳐 관찰하되 OECD TG 438에서 요구하는 것과 같이 시험물질의 균일한 적용에도 불구하고 국소적 영향을 유발하는 시험물질(예: 일부 고형 화학물질)의 경우는 제외한다. 이 경우 평가는 노출 부위에서 나타나는 국소적 영향을 기반으로 해야 한다.

** 상층부, 중간층 및 하층부는 각각 상피층의 3분의 1씩을 차지한다. 상층부가 없어진 경우, 중간층이 '새로운' 상층부가 되는 게 아니며 여전히 중간층이다(자세한 내용은 OECD GD 160의 부록 2 참조⁽¹²⁾).

*** 붙어 있는 세포/조직의 괴사만.

† 괴사세포는 각막 전체 길이에 걸쳐 계수한다(사용된 닭 안구의 크기 및 현미경으로 평가된 표본의 길이에 변동이 없어 각 슬라이드에서 각막의 전체 길이가 일정하기 때문에 세포 계수에 사용할 길이가 고정될 필요 없음). 괴사세포 정도에 대한 점수 체계는 '정상(normal)'부터 '경미함(slight)'까지는 절대 세포계수(absolute cell count)를 사용하며, '보통(moderate)'과 '심각(severe)'은 백분율을 사용한다. 이는 검사자가 평가하는 방식에 따른 것이다: 괴사세포는 각각 개별로 보인다. 괴사세포의 수가 많으면 일반적으로 분산되어(scattered) 있으며 검사자는 괴사량의 정도를 파악하기 위해 세포를 계수한다. 이는 미란(부식)의 경우와는 상반된 것으로 미란(부식)에서는 처음부터 상피층의 일부 소실이 명확하기 때문에 추정 손실률(estimated percentage of loss)을 사용하는 것이 타당하다.

†† ICE 시험법에서는 세극등현미경을 사용하여 각막 두께를 정밀 측정하고 있다. 따라서 기질 종창(swelling of the stroma)은 후속의 조직병리 평가에서 별도로 점수화하지 않는다.

††† 점수화된 기질층의 영향은 (1) 생체내(*in vivo*) 노출 후 토끼 각막에서 관찰된 사항(각막세포 손실/괴사)에 기초하여 Maurer(2001)가 사용한 점수 체계에서 비롯한 농축핵(pyknotic nuclei)과 (2) 섬유 이상(disorder of fibre)으로 구성된다. (1)의 경우, 농축핵은 매우 가끔씩 관찰되며 농축핵 발생(development of pyknotic nuclei)은 각막의 손상 깊이 및/또는 염증 발생과정(inflammation process)(생체내(*in vivo*))에 따라 영향을 받는다. 또한 기질층의 길어진 섬유아세포 때문에 정상핵이 세포 단면에 따라 농축핵으로 오인될 수 있다. (2)의 경우, 기질층의 섬유가 이미 자연적으로 이상을 보이기 때문에 섬유 이상의 관찰 및 점수화가 어려울 수 있다. 또한 현미경 관찰을 위한 각막 처리(processing)도 기질층의 섬유에 대한 인위적 이상(artificial disorder)을 일으킬 수 있다. 두 경우 모두(농축핵 및 섬유 이상)에서 이러한 관찰 사항들은 세극등현미경 관찰에서 이미 확인된 심각한 각막 영향과 일치하며, 상피 중간층 또는 하층부에서 관찰된 영향과도 일치한다.

52. OECD TG 438은 안구 표면에 시험물질 처리 시 물질이 균일하게 퍼지는 것이 필요하다. 따라서 시험물질은 적출된 닭 안구의 각막에 균일한(homogenous) 영향을 야기하고, 전체 슬라이드에 걸쳐 조직병리학적 영향의 평균을 점수화하여야 한다. 단, 일부 시험물질은 균일하게 적용했음에도 불구하고 특정 부위에 한정된 국소(focal) 또는 다국소적(multifocal) 영향을 일으킬 수 있다(예: 일부 고체 시험물질의 경우). ICE 시험을 실시하는 과정에서 국소 또는 다국소적 영향이 관찰되면 조직병리학자에게 알리고, 시험물질이 노출된 부위에서 관찰된 국소적 부작용(adverse effect)에 근거하여 조직병리 평가 점수를 매겨야 한다. 또한 의심의 여지가 있는 경우(예: ICE 결과와 조직병리학적 관찰이 일치하지 않음), 관찰 단면에서의 국소적 영향(localized effect)을 확인하기 위해 각막의 다른 부위에서 추가 표본을 준비한다.

시험자료 및 보고

데이터 평가

53. 각막 혼탁도(opacity), 각막 종창(swelling), 플루오레세인 잔류도(fluorescein retention) 결과를 개별적으로 평가하여 각 평가항목의 ICE 분류를 도출한다. 그리고 각 평가항목의 ICE 분류를 종합하여 시험물질의 생체외 분류(In Vitro Classification)를 예측한다. 마찬가지로 조직병리 평가(해당되는 경우)는 별도로 시행되고 55항 및 56항에 따라 고려되어야 한다.

결정 기준

54. 각 평가항목을 평가한 후 사전에 정한 범위에 근거하여 ICE 분류를 정한다. 4개의 ICE 분류를 아래의 기준에 따라 각막 종창(표 4), 각막 혼탁도(표 5) 및 플루오레세인 잔류도(표 6)를 판정한다. 표 4의 각막 종창 점수는 두께 측정기 no. 1이 장착되고 세극 폭 조정이 $9\frac{1}{2}$ (0.095 mm)인 Haag-Streit BP900 세극등현미경(또는 Haag-Streit BQ900 세극등현미경)으로 측정한 경우에만 적용 가능하다는 것이 중요하다. 사용자들은 세극 폭 셋팅이 달라지면 세극등현미경의 각막 두께 측정값이 달라질 수 있다는 것을 인식 해야한다.

표 4. 각막 종창에 대한 ICE 분류 기준

평균 각막 종창(%)*	ICE 분류
0 ~ 5	I
> 5 ~ 12	II
> 12 ~ 18(< 처리 후 75분)	II
> 12 ~ 18(= 처리 후 75분)	III
> 18 ~ 26	III
> 26 ~ 32(< 처리 후 75분)	III
> 26 ~ 32(= 처리 후 75분)	IV
> 32	IV

참고: * 모든 관찰 시점에서의 최고 평균점수

표 5. 각막 혼탁도에 대한 ICE 분류 기준

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

참고: * 모든 관찰 시점에서의 최고 평균점수(표 1의 혼탁도 점수에 근거). *표 2에 정의된 점수에 근거함.

표 6. 플루오레세인 잔류도에 대한 ICE 분류 기준

처리 30분 후 평균 플루오레세인 잔류도 점수*	ICE 분류
0.0 ~ 0.5	I
0.6 ~ 1.5	II
1.6 ~ 2.5	II
2.6 ~ 3.0	IV

참고: * 표 2에 정의된 점수에 근거함.

55. 시험물질에 대한 생체외 분류(In Vitro Classification)는 표 7에 명시된 대로 각막 종창, 각막 혼탁도 및 플루오레세인 잔류도로 얻은 카테고리를 종합한 것과 해당되는 UN GHS 분류에 따라 평가한다.

표 7. 종합 생체외 분류(In Vitro Classification)

UN GHS 분류	3가지 평가항목의 조합
No Category	3 × I
	2 × I, 1 × II
	2 × II, 1 × I
예측 불가	기타 조합
Category 1	3 × IV
	2 × IV, 1 × III
	2 × IV, 1 × II*
	2 × IV, 1 × I*
	30분 시점의 각막 혼탁도 = 3(2개 이상의 안구)
	모든 시점의 각막 혼탁도 = 4(2개 이상의 안구)
	심한 상피 이완(1개 이상의 안구)

참고: * 조합 가능성이 낮음.

56. pH가 극단적이지 않은(non-extreme, $2 < \text{pH} < 11.5$) 세정제 및 계면활성제에 대하여 조직병리 평가를 실시하는 경우 표 8의 결정 기준을 사용해야 한다. 또한 3개 중 2개 이상의 안구에서 기질층의 농축핵 점수가 \geq 가벼움(1점)으로 관찰되는 경우, 또는 3개 중 2개 이상의 안구에서 내피층의 영향이 관찰되는 경우에는 관찰 결과를 기록하여 영향의 심각도를 나타내야 한다.

표 8. UN GHS Category 1 pH가 극단적이지 않은(non-extreme, 2 < pH < 11.5)의 세정제 및 계면활성제 식별을 위해 표준 검증 ICE 시험법과 함께 사용되는 조직병리 평가 결정 기준

조직층	심한 안손상을 유발하는(GHS Category 1) 영향 확인
상피층	<ul style="list-style-type: none"> - 미란(부식) = 보통(2점) : 안구 3개 중 적어도 2개에서 관찰됨 - 밋/또는, 공포(액포)화(= 매우 가벼움, 1/2점) : 안구 3개 중 적어도 2개의 중간 또는 하층부에서 관찰됨 - 또는, 미란(부식) = 보통(2점) : 안구 3개 중 1개에서 관찰됨 + 공포(액포)화 = 매우 가벼움(1/2점) : 안구 3개 중 적어도 하나 이상의 중간 또는 하층부에서 관찰될 경우 - 밋/또는, 괴사 = 보통(2점) : 안구 3개 중 적어도 2개에서 관찰됨

57. 또한 표 9의 예측모델을 사용해야 한다. ICE 조직병리 평가 기준 및 표 8과 9의 예측모델은 UN GHS Category 1 pH가 극단적이지 않은(non-extreme, 2 < pH < 11.5) 세정제 및 계면활성제를 식별하는 경우에만 적용된다.

표 9. ICE 조직병리 평가에 기초한 pH가 극단적이지 않은(non-extreme, 2 < pH < 11.5) 세정제 및 계면활성제 식별을 위한 예측모델

표준 ICE	표 8의 ICE 조직병리 평가	UN GHS 분류
예측 불가	기준 충족	UN GHS Category 1
	기준 미충족	예측 불가

연구 인정 요건

58. 동시 음성대조군 또는 용매/부형제대조군과 동시 양성대조군이 각각 GHS No Category와 GHS Category 1로 식별되면 시험을 인정하는 것으로 간주된다.

시험 보고서

59. 시험 보고서는 시험의 수행과 관련된 경우 다음의 정보를 포함해야 한다.

시험물질 및 대조물질

- 화학물질의 정보(IUPAC 또는 CAS 등록명, CAS 등록번호, SMILES 또는 InChI 코드, 구조식, 및 다른 식별자료)
- 가능한 범위에서 시험/대조물질(또는 혼합물)의 순도 및 구성(중량별 백분율)
- 다성분 화합물 및 UVCB: 구성물질의 화학물질 정보(위 참고), 순도, 양적 비율과 적절한 물리화학적 특성(위 참고) 등의 정보(가능한 범위로)
- 물리적 상태, 휘발성, pH, 안정성, 화학적 분류, 물에 대한 용해도, 시험 수행과 관련된 추가적인 물리화학적 특성
- 해당하는 경우 시험 전 처리방법(예: 가온, 분쇄)
- 보관 조건 및 안정성(가능한 범위로)

시험 의뢰기관 및 시험기관 관련 정보

- 시험의뢰기관, 시험기관, 연구책임자의 이름 및 주소, 해당하는 경우 조직병리 전문가도 포함
- 안구 출처 정보(예: 안구 수집 시설)

시험법 조건

- 시험계 설명
- 세극등현미경 및 두께 측정기(예: 모델), 기기 설정
- 과거 음성 및 양성대조군 결과에 대한 참고문헌, 해당하는 경우, 동시 기준 대조군(benchmark control) 허용 범위를 보여주는 과거 데이터
- 시간의 경과에 따른 시험법의 무결성(예: 정확도 및 신뢰도)을 보장하기 위한 절차(예: 정기적인 숙련도물질 시험)
- 조직병리 평가가 시행되는 경우, 조직 고정 절차

안구 수집 및 준비

- 닭의 주령 및 무게, 해당하는 경우 안구가 수집된 닭의 기타 특성(예: 성별, 종)
- 안구의 보관 및 운반 조건(예: 안구 수집 날짜와 시간, 닭 머리 수집 후 관류 챔버에 안구 배치까지의 시간 간격)
- 안구 준비 및 장착(안구의 품질, 안구 챔버 온도 및 시험에 사용되는 선별 기준 등에 대한 기술 포함)

시험 절차

- 반복시험 수
- 음성대조물질 및 양성대조물질 정보(해당하는 경우, 용매 및 기준 대조물질)
- 시험물질 용량, 적용 및 노출 시간
- 관찰 시점(처리 전후)
- 평가 및 결정 기준 설명(해당하는 경우, 조직병리 평가 포함)
- 해당하는 경우, 조직병리학적 관찰에 대한 전문 평가(peer-review) 시스템
- 시험 인정요건에 대한 설명
- 시험 절차의 모든 변경사항에 대한 설명
- 또한 표준작업지침서(SOP) 등에 포함되지 않는 경우 가능하면 다음의 정보를 포함해야 한다.
- 통합 교육 및 전수 가능성 설명
- 고정제, 탈수제, 정확제 및 프로토콜
- 포매에 사용한 재료, 침투용매(infiltration solvent) 및 농도
- 조직 단면 두께
- 염색(보고서) 및 관련 염색 프로토콜
- 장비 정보

결과

- 각각의 안구에 대한 각 관찰 시점의 각막 종창 및 혼탁도, 플루오레세인 잔류도 점수의 표(tabulation)(각 관찰시점의 모든 안구에 대한 평균 점수 포함)
- 관찰된 모든 형태학적 영향 설명
- 모든 시점에서 각막 종창, 혼탁도, 플루오레세인 잔류도 점수의 평균 점수의 최고값, 해당 ICE 분류
- 해당하는 경우, 조직병리 반-정량적 점수 관찰 표 및 도출된 결론
- 해당하는 경우, 조직병리 평가 점수에 국소적 영향의 반영에 대한 표시
- 관찰된 모든 기타 영향 설명
- 도출된 생체외(*in vitro*) GHS 분류
- 해당하는 경우, 처리군 및 대조군의 안구 사진
- 해당하는 경우, 조직병리 표본의 디지털 이미지 또는 디지털 슬라이드 스캔 (선택사항)

결과 고찰

결론

참고문헌

- (1) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report - In Vitro Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Available at:
[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmmer.htm]
- (2) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic in vitro assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. Available at:
[<http://ecvam.jrc.it/index.htm>].
- (3) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report . Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Mild/Moderate Ocular Irritants: The Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 10-7553A. Available at:
[<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm>]
- (4) 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.pdf.

- (5) OECD (2018). Streamlined Summary Document Supporting OECD Test Guideline 438 on the Isolated Chicken Eye for Eye Irritation/Corrosion. Series on Testing and Assessment No 188. ENV Publications, OECD, Paris.
- (6) OECD (2018). Test Guideline 492. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage. 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.
- (7) 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.
- (8) Adriaens E., Barroso J., Eskes C., Hoffmann S., McNamee P., Alepee N., Bessou-Touya S., De Smedt A, de Wever B., Pfannenbecker U., Tailhardat M., Zuang V. (2014). Draize test for serious eye damage / eye irritation: importance of the endpoints evaluated with regard to UN GHS / EU CLP classification. *Archives of Toxicology* 88, 701-723.
- (9) Cazelle E., Eskes C., Hermann M., Jones P., McNamee P., Prinsen M., Taylor H., Wijnands M.V.W. (2014). Suitability of histopathology as an additional endpoint to the isolated chicken eye test for classification of non-extreme pH detergent and cleaning products. *Toxicology In Vitro* 28, 657-666.
- (10) Reproducibility and predictive capacity of the Isolated Chicken Eye Test for the identification of non-extreme pH detergents and surfactants causing serious eye damage. Manuscript in preparation

- (11) 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.
- (12) OECD (2018) Guidance Document on “The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-Severe Irritants. Series on Testing and Assessment No. 160. Error! Hyperlink reference not valid. Available at: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (13) Prinsen, M.K. and Koeter, B.W.M. (1993). Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. *Fd. Chem. Toxicol.* 31, 69-76.
- (14) DB-ALM (INVITTOX) (2009). Protocol 80: Chicken enucleated eye test (CEET) / Isolated Chicken Eye Test, 13pp. Available at: [<http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>].
- (15) Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. and Spielmann H. (1995). The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicol. In Vitro* 9, 871-929.
- (16) Prinsen, M.K. (1996). The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. *Food Chem. Toxicol.* 34, 291-296.

- (17) Chamberlain, M., Gad, S.C., Gautheron, P. and Prinsen, M.K. (1997). IRAG Working Group I: Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation. *Food Chem. Toxicol.* 35, 23-37.
- (18) ICCVAM. (2006). Background review document: Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method. NIH Publication No.: 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.html]
- (19) Cazelle E., Eskes C., Hermann M., Jones P., McNamee P., Prinsen M., Taylor H., Wijnands M.V.W. (2015). Suitability of the Isolated Chicken Eye Test for Classification of Extreme pH Detergents and Cleaning Products. *Toxicology In Vitro* 29, 609-616.
- (20) Prinsen, M.K. (2006). The Draize Eye Test and in vitro alternatives; a left-handed marriage? *Toxicology in Vitro* 20, 78-81.
- (21) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Available at: [<http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf>].
- (22) Barroso J., Pfannenbecker U., Adriaens E., Alepee 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.

- (23) Morton D., Sellers R.S., Barale-Thomas E., Bolon B., George C., Hardisty J.F., Irizarry A., McKay J.S., Odin M., Teranishi M. (2010). Recommendations for Pathology Peer Review. *Toxicol. Pathol.* 38, 1118-1127.
- (24) OECD (2014). Advisory document n. 16. Guidance on the good laboratory practice (GLP) Requirements for Peer Review of Histopathology. OECD Series on principles of good laboratory practice and compliance monitoring. Advisory document of the working group on GLP. ENV/JM/MONO(2014)30. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdseriesonprinciplesofgoodlaboratorypracticeglpandcompliancemonitoring.htm>.
- (25) Burton, A.B.G., M. York and R.S. Lawrence (1981). The in vitro assessment of severe irritants. *Fd. Cosmet. Toxicol.* 19, 471-480.
- (26) 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): 시험 결과와 허용된 참고치의 일치 정도. 시험 수행에 대한 평가 척도이고 "상관성(relevance)"의 한 측면이다. 정확도는 정확하게 맞춘 시험결과의 비율을 의미하는 "일치도(concordance)"와 같은 의미로 종종 쓰임.

참고물질(Benchmark chemical): 시험물질의 비교 기준으로 사용되는 물질. 참고물질은 다음의 특성을 가져야 함. (i) 일관성 있고 신뢰할 수 있는 공급원, (ii) 시험되는 물질과 구조적 및 기능적 유사성, (iii) 알려진 물리적/화학적 특성, (iv) 알려진 효과 입증 자료, (v) 원하는 반응 범위 내 알려진 효력

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

각막(Cornea): 홍채와 동공을 감싸고 빛을 통과시키는 안구 전면의 투명한 부위.

각막 혼탁도(Corneal opacity): 시험물질에 대한 노출에 따른 각막의 불투명 정도. 각막 혼탁도가 높아지면 각막 손상을 의미함.

각막 종창(Corneal swelling): ICE 시험에 있어서 시험물질 노출 후 각막의 팽창에 대한 객관적인 측정치. 이는 처리 전 각막 두께와 ICE 시험 시 시험물질에 노출된 후 일정한 시간 간격으로 기록한 두께의 백분율로 나타냄. 각막 종창의 정도는 각막 손상의 지표임.

세정제(Detergents): 세정 및 세척을 위해 하나 이상의 계면활성제가 포함된 복합물질(단일 계면활성제의 희석 제외) 최종 농도는 3% 초과(∧)임. 세정제는 어떤 형태(액체, 분말, 페이스트, 바, 덩어리, 몰드 조각, 모양 등)든 될 수 있고, 가정용 또는 기관용, 산업용으로 판매 또는 사용됨.

안자극(Eye Irritation): 안구 앞면에 시험물질 적용 후 나타나는 변화로서 물질 적용 후 21일 이내에 회복이 됨. "눈에 미치는 가역적인 영향" 및 "UN GHS Category 2"와 같은 의미로 사용됨⁽⁴⁾.

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 음성물질의 비율이며, 시험법 수행 지표 중 하나임.

플루오레세인 잔류도(Fluorescein retention): ICE 시험법에서 시험물질에 노출된 후 각막의 상피세포에 남아 있는 플루오레세인나트륨의 양을 나타내는 주관적인 측정치. 플루오레세인 잔류도는 각막 상피 손상의 지표임.

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

IATA(Integrated Approach on Testing and Assessment): 통합독성평가

눈에 미치는 비가역적인 영향(Irreversible effects on the eye): "심한 안손상" 및 "UN GHS Category 1" 참조.

혼합물(Mixture): 서로 반응하지 않는 두 가지 이상의 물질로 구성된 혼합물질 또는 용액⁽⁴⁾.

음성대조물질(Negative control): 시험계의 모든 구성성분을 포함하며 양성반응을 일으키지 않는 물질로 처리한 군. 시험물질을 처리한 군 및 다른 대조군과 같이 실험하며 용매가 시험계에 반응하는지를 확인함.

미분류(Not Classified): 안자극(UN GHS Category 2) 또는 심한 안손상(UN GHS Category 1)으로 분류되지 않은 화학물질. "UN GHS No Category" 의미와 바꾸어 사용할 수 있음.

양성대조군(Positive control): 시험계의 모든 구성요소를 포함하고 시험계에서 양성반응을 유도한다고 알려진 물질로 처리한 군. 시간에 따른 양성대조군 반응의 변동성을 평가할 수 있다는 확신을 갖기 위하여 양성반응의 범위가 초과해서는 안 됨.

신뢰도(Reliability): 동일한 시험방법에 따라 반복시행하였을 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 가역적인 영향(Reversible effects on the Eye): "안자극" 및 "UN GHS Category 2" 참조.

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

세극등현미경(Slit-lamp microscope): 입체적 정립상을 보여주는 양안 현미경의 확대 하에 안구를 직접 관찰하는데 사용되는 기구(instrument). ICE 시험법에서는 세극등현미경을 사용하여 닭 안구의 앞쪽 구조를 관찰하고, 내장된 두께 측정기(depth-measuring device)로 각막 두께를 객관적으로 측정함.

용매/부형제대조군(Solvent/vehicle control): 용매나 부형제 등 시험계의 모든 요소를 포함하지만 시험물질은 처리되지 않은 군. 시험물질을 처리한 군 및 다른 대조군과 함께 실험되며 용매·부형제에 녹여진 시험물질로 처리한 군의 기본적인 반응을 평가하기 위해 사용된다. 음성대조군으로 동시 사용될 때, 용매·부형제에 대한 시험계와의 반응여부를 보여줌.

물질(Substance): 생산과정을 통해 얻어지거나 또는 자연 상태로 얻는 화학원소들(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⁽⁴⁾.

계면활성제(Surfactants): 표면활성제라고도 하며, 하나 이상의 친수성 물질 또는 하나 이상의 친수성 물질군으로 구성된 물질 또는 희석제(적절한 용매/부형제에서)로 액체의 표면장력을 낮추어 물-대기에서 확산 또는 흡수 단층을 형성하며, 유탁액 또는 마이크로유탁액, 미셀(micelle)을 생성하고 물-고체에 흡수됨.

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(Test chemical): 시험법에서 평가되는 화학물질(단일물질 또는 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 검토한다. 예를 들어, 만약 어떤 시험물질의 자극 가능성이 기존 자료를 근거로 평가할 수 있다면, 추가적인 시험을 할 필요는 없다. 하지만 어떤 시험물질의 자극 가능성이 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 분류체계로 그림문자, 표시방법, 유해 사항, 사전 주의 사항, 안전정보지 등의 소통 방식을 통해 화학물질의 유해 정보를 전달하여 사람(고용주, 근로자, 운송자, 소비자, 응급처치자 등)과 환경을 보호하고자 제시된 체계⁽⁴⁾.

UN GHS Category 1: "심한 안손상" 및 "눈에 미치는 비가역적인 영향" 참고.

UN GHS Category 2: "안자극" 및 "눈에 미치는 가역적인 영향" 참고.

UN No Category: UN GHS Category 1 또는 2(2A 또는 2B)로 분류되지 않는 화학물질. "Not Classified"로 바꾸어 사용할 수 있음.

검증된 시험법(Validated test method): 특정한 목적에 대한 상관성(정확도 포함)과 신뢰도를 평가하기 위한 검증연구를 마친 시험법. 검증된 시험법이 정확도와 신뢰도 측면에서 제시된 목적에 적합하다고 판단될 정도로 충분하지 않을 수 있다는 점에 유의함.

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

부록 2. 숙련도 물질

실험실은 본 시험 가이드라인을 준수하는 시험법을 사용하기 전에 13개의 권장 화학물질(표 10)에 대한 안 유해성 분류를 정확하게 파악하여 기술적 숙련도를 입증해야 한다. 제시된 ICE 결과는 시험 과정에서 예상되는 관찰 반응 범위를 보여준다⁽⁵⁾⁽¹⁸⁾. 이러한 화학물질들은 생체내(*in vivo*) 토끼 안자극 시험(TG 405) 및 UN GHS 분류 체계(예: UN GHS Category 1, 2A, 2B, No Category)의 결과에 근거하여 안 유해성에 대한 반응 범위를 나타내기 위해 선정되었다⁽⁴⁾⁽²⁶⁾. 다른 선정 기준은 가능한 물질이 재현 가능한 ICE 시험법 결과를 가지고, 상업적으로 구입이 가능하며 고품질의 이용 가능한 생체내(*in vivo*) 참조 데이터가 있는 것이다. 참고 데이터는 Streamlined Summary Document(SSD)⁽⁵⁾에서 확인할 수 있다. 표에 제시된 물질을 구입할 수 없거나 다른 타당한 이유로 사용할 수 없는 경우에는 ICE 시험법의 평가 및 검증에 사용된 시험물질 등에서 위의 기준을 충족하는 다른 물질을 사용할 수 있다⁽⁵⁾⁽¹⁸⁾. 단, 이러한 변경에 대한 타당한 근거가 제시되어야 한다.

표 10. ICE 기술 숙련도 입증을 위한 권장 물질

No.	화학물질	CASRN	화학물질 분류 ¹⁾	물리적 형태	생체내(<i>in vivo</i>) UN GHS 분류 ²⁾	ICE UN GHS 분류 ³⁾⁴⁾
1	Benzalkonium chloride(10%)	8001-54-5	Onium compound	액체	Category 1	Category 1
2	Chlorhexidine	55-56-1	Amine, amidine	고체	Category 1	Category 1
3	Sodium hydroxide(10%)	1310-73-2	Alkali	액체	Category 1	Category 1
4	Imidazole	288-32-4	Heterocyclic	고체	Category 1	Category 1
5	Trichloroacetic acid(30%)	76-03-9	Carboxylic acid	액체	Category 1	Category 1
6	2,6- Dichlorobenzoyl chloride	4659-45-4	Acyl halide	액체	Category 2A	예측 불가 ⁴⁾
7	Ammonium nitrate	6484-52-2	Inorganic salt	고체	Category 2A ⁵⁾	예측 불가 ⁴⁾
8	Sodium hydroxide(1%)	1310-73-2	Alkali	액체	Category 2B	예측 불가 ⁴⁾
9	Dimethyl sulfoxide	67-68-5	Organic sulphur compound	액체	No Category	No Category
10	Ethyl trimethyl acetate	3938-95-2	Ester	액체	No Category	No Category
11	Methylcyclopentane	96-37-7	Hydrocarbon (cyclic)	액체	No Category	No Category
12	n-Hexane	110-54-3	Hydrocarbon (acyclic)	액체	No Category	No Category
13	Triacetin	102-76-1	Lipid	액체	No Category	No Category

약어: CASRN(Cheical Abstracts Service Registry Number) = 화학초록서비스등록번호, ICE(Isolated Chicken Eye test): 적출된 닭 안구 시험, n.a.: 해당 없음, UN GHS(United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) = 국제연합 화학물질 분류 및 표시에 관한 국제조화 시스템⁴⁾.

- 1) 화학물질 분류는 표준분류체계(standard classification scheme)를 사용하여 각각의 화학물질에 지정되었으며 미국 국립 의학도서관 의학주제표목(Medicine Medical Subject Headings, MeSH) 분류 체계에 기초하고 있다 (<http://www.nlm.nih.gov/mesh>)
- 2) 생체내(*in vivo*) 토끼 안자극 시험(OECD TG 405)의 결과에 근거하며 UN GHS⁴⁾²⁶⁾를 사용하고 있다.
- 3) 표 7에 기술된 대로 ICE의 결과에 근거하고 있다.
- 4) GHS No Category 및 GHS Category 1의 구별을 위해 표 6에 기술된 내용 이외의 ICE 점수 조합(표 7 참조)
- 5) 이러한 두 Category는 UN GHS 기준 판정에 따라 2A 또는 2B로 분류됨. 즉, 7일 차에 3마리 동물 중 1마리 대 3마리 동물 중 2마리에 따라 Category 2A로 분류된다. 생체내(*in vivo*) 연구는 3마리의 동물을 포함했다. 한 마리의 동물에서의 결막 출혈을 제외하고, 모든 평가항목이 7일 이내에 0점으로 회복되었다. 7일까지 완전하게 회복되지 않은 한 마리의 동물에서는 각막 출혈 1점(7일 차)이었지만 10일 차에 완전히 회복되었다.

부록 3. 비극성 pH($2 < \text{pH} < 11.5$) 세정제 및 계면활성제의 제한적 적용 범위에 대해 표준 ICE 시험법과 함께 사용되는 ICE 조직병리 평가 관련 숙련도 시험물질

실험실은 비극성 pH($2 < \text{pH} < 11.5$) 세정제 및 계면활성제의 제한적 사용 범위에 대해 표준 ICE 시험법과 함께 ICE 조직병리 평가를 실시하기 전에 표 11에서 권장하는 6개 시험물질에 대한 안 유해성 분류를 정확하게 파악하여 기술적 숙련도를 입증해야 한다. 이러한 물질들은 생체내(*in vivo*) 토끼 안자극 시험(TG 405) 및 UN GHS 분류 체계(예: UN GHS Category 1, 2, No Category)의 결과에 기반하여 안 유해성에 대한 반응 범위를 나타내기 위해 선정되었다⁽⁴⁾⁽²⁶⁾. 다른 선정 기준은 가능한 한 물질이 재현 가능한 ICE 조직병리 평가 결과를 가지고, 상업적으로 구입이 가능하며 고품질의 이용 가능한 생체내(*in vivo*) 참고 데이터가 있는 것이다. 표에 제시된 물질을 구입할 수 없거나 다른 타당한 이유로 사용할 수 없는 경우에는 ICE 조직병리 평가에 사용된 시험물질 등에서 위의 기준을 충족하는 다른 물질을 사용할 수 있다⁽¹⁰⁾. 단, 이러한 변경에 대한 타당한 근거가 제시되어야 한다.

표 11. ICE 조직병리 평가 기술 숙련도를 입증하는 권장 물질

No.	화학물질	CASRN	계면활성제 유형	물리적 형태	생체내(<i>in vivo</i>) 분류 ¹⁾	표준 ICE UN GHS 분류 ²⁾	ICE 조직병리 평가 UN GHS 분류 ³⁾
1	Benzalkonium chloride(5%)	8001-54-5	Cationic	액체	Category 1	Category 1	실험실 3곳 중 3곳에서 Category 1 (미란(부식))
2	Benzsulphonyl chloride	98-09-9	Anionic	액체	Category 1	Category 1	실험실 3곳 중 3곳에서 Category 1 (괴사 및 공포(액포)화)
3	Cetylpyridinium bromide(10%)	140-72-7	Cationic	액체	Category 1	예측 불가	실험실 3곳 중 3곳에서 Category 1 (공포(액포)화)
4	Cetylpyridinium bromide(1%)	140-72-7	Cationic	액체	Category 2A	예측 불가	실험실 3곳 중 3곳에서 예측불가
5	N-Lauroyl sarcosine Na salt(10%)	137-16-6	Anionic	액체	Category 2A	예측 불가	실험실 3곳 중 3곳에서 예측불가
6	Cetylpyridinium bromide(0.1%)	140-72-7	Cationic	액체	No Category	예측 불가	실험실 3곳 중 3곳에서 예측불가

약어: CASRN(Chemical Abstracts Service Registry Number) = 화학초록서비스등록번호, NPCM(No Prediction Can Be Made): 예측 불가

1. 생체내(*in vivo*) 토끼 안자극 시험(OECD TG 405) 결과에 근거하며 UN GHS를 사용하고 있다⁽⁴⁾⁽²⁶⁾.
2. 표 7의 ICE 결과에 근거한다.
3. 표 8과 9의 ICE 조직병리 평가 기준에 근거하며 개정된 OECD GD 160에 속한다⁽¹²⁾.

부록 4. 관류장치 및 눈 클램프 도표

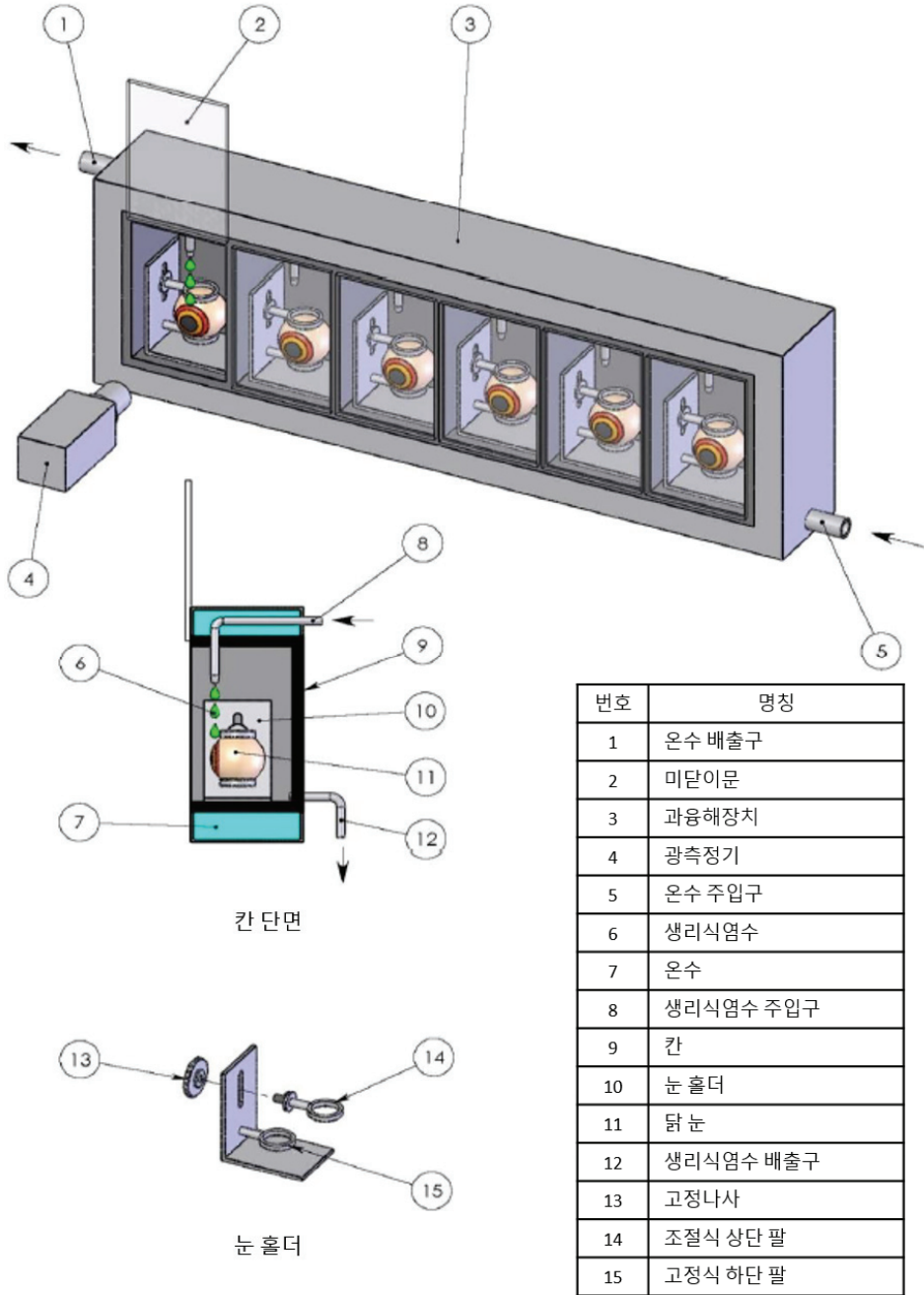


그림 1. 관류장치 및 눈 클램프 도표

OECD/OCDE

438

Adopted:
25 June 2018*OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF
CHEMICALS*Isolated chicken eye 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 Isolated Chicken Eye (ICE) test method was evaluated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM), in conjunction with the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) and the Japanese Centre for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM), in 2006 and 2010 (1) (2) (3). In the original evaluation, the ICE was endorsed as a scientifically valid test method for use as a screening test to identify chemicals (substances and mixtures) inducing serious eye damage (Category 1) as defined by the United Nations (UN) Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) (1) (2) (4). A re-evaluation of the *in vitro* and *in vivo* dataset used in the validation study concluded that the ICE test method could also be used to identify chemicals not requiring classification for eye irritation and serious eye damage as defined by the UN GHS which led to the revised version of TG 438 adopted in 2013 (4) (5). Since then, the Decision Criteria used to identify chemicals not requiring classification according to the UN GHS Classification System, has been revised based on the latest acceptance standards (5) (6) (7) (8). Furthermore, histopathology has been shown to be a useful additional endpoint to identify UN GHS Category 1 non-extreme pH ($2 < \text{pH} < 11.5$) detergents and surfactants (9) (10). This Test Guideline (adopted in 2009 and updated in 2013 and in 2018) includes the latest recommended uses and limitations of the ICE test method based on these evaluations.

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 irritation for different chemical classes. However, strategic combinations of alternative test methods within a (tiered) testing strategy and/or Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) may be able to

© OECD, (2018)

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

In accordance with the decision of the Council on a delegation of authority to amend Annex I of the decision of the council on the Mutual Acceptance of Data in the assessment of chemicals [C(2018)49], this Guideline was amended by the OECD's Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology by written procedure on 25 June 2018.

replace the Draize eye test (7)(11). The Top-Down 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 (7)(11). The ICE 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 11 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 ICE test method is recommended as an initial step within a testing strategy such as the Top-Down approach recommended within the OECD GD 263 (7) to identify chemicals inducing serious eye damage, i.e., chemicals to be classified as UN GHS Category 1 without further testing (4). The ICE 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 (No Category) (4), and may therefore be used as an initial step within a Bottom-Up testing strategy approach (OECD GD 263 (7)). However, a chemical that is not predicted as causing serious eye damage or as not classified for eye irritation/serious eye damage with the ICE test method would require additional information to establish a definitive classification. Choice of the most appropriate test method(s) and use of this Test Guideline should be seen in the context of the OECD Guidance Document on an Integrated Approach on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation (7). Furthermore, the appropriate regulatory authorities should be consulted before using the ICE test method in a Bottom-Up approach for classification schemes other than the UN GHS.

3. The purpose of this Test Guideline is to describe the procedures used to evaluate the eye hazard potential of a test chemical as measured by its ability to induce or not induce toxicity in the enucleated eyes of chicken. Toxic effects to the cornea are measured by (i) a qualitative assessment of opacity, (ii) a qualitative assessment of damage to epithelium based on application of fluorescein to the eye (fluorescein retention), (iii) a quantitative measurement of increased thickness (swelling), and (iv) a qualitative evaluation of macroscopic morphological damage to the surface of the treated eyes. The corneal opacity, swelling, and damage assessments following exposure to a test chemical are assessed individually and then combined to derive an Eye Irritancy Classification. Furthermore, histopathological observations may also be used as an additional endpoint to potentially improve the prediction of UN GHS Category 1 non-extreme pH ($2 < \text{pH} < 11.5$) detergents and surfactants (see paragraphs 8 and 56).

4. Definitions are provided in Annex 1.

INITIAL CONSIDERATIONS AND LIMITATIONS

5. This Test Guideline is based on the protocol suggested in the OECD Guidance Document 160 (12), which was originally adopted in 2011 and further updated in 2017 and 2018. The protocol is based on information obtained from published protocols (13) (14) (15) (16) (17).

6. A wide range of chemicals has been tested in the evaluation underlying this Test Guideline and the overall database currently amounts to 184 test chemicals including 75 substances and 109 mixtures (5). The Test Guideline is applicable to solids, liquids, emulsions and gels. The liquids may be aqueous or non-aqueous; solids may be soluble or insoluble in water. Gases and aerosols have not been assessed yet in a validation study.

7. The ICE test method can be used to identify chemicals inducing serious eye damage, i.e., chemicals to be classified as UN GHS Category 1 (4). When used for this purpose, the identified limitations for the ICE test method are based on the high false positive rates for alcohols and the high false negative rates for solids and surfactants (1) (3) (18). Moreover, test chemicals inducing persistent non severe effects in vivo may also risk underprediction (22). However, false negative rates in this context (UN GHS Category 1 identified as not being UN GHS Category 1) 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. Furthermore, histopathology was found to be a useful additional endpoint to decrease the false negative rates when used to identify UN GHS Category 1 non-extreme pH ($2 < \text{pH} < 11.5$) detergents shown to induce mainly persistent non severe effects in vivo (and surfactants (9) (10) (19). Regarding solids, it should be noted that these may lead to variable and extreme exposure conditions in the in vivo Draize eye irritation test, which may result in irrelevant predictions of their true irritation potential (20). Investigators could consider using this test method for all types of chemicals, whereby a positive result should be accepted as indicative of serious eye damage, i.e., UN GHS Category 1 classification without further testing. However, positive results obtained with alcohols should be interpreted cautiously due to risk of over-prediction.

8. When used to identify chemicals inducing serious eye damage (UN GHS Category 1), the ICE test method (without use of histopathology) was found to have an overall accuracy of 83% (142/172), a false positive rate of 7% (9/127) and a false negative rate of 47% (21/45) when compared to in vivo rabbit eye test method data classified according to the UN GHS classification system (4) (5). When histopathology is considered as an additional endpoint to identify UN GHS Category 1 non-extreme pH ($2 < \text{pH} < 11.5$) detergents and surfactants, the false negative rate of the ICE test method and its accuracy are improved (from 64% to 27% false negatives ($n=22$) and from 53% to 77% accuracy ($n=30$)), whilst an acceptable false positive rate is maintained (from 0% to 12.5% false positives ($n=8$)) (10).

9. The ICE test method can also be used to identify chemicals that do not require classification for eye irritation or serious eye damage under the UN GHS classification system (4). The test method can be used for all types of chemicals, whereby a negative result could be accepted for not classifying a chemical for eye irritation and serious eye damage. However, on the basis of one result from the validation database, anti-fouling organic solvent-containing paints may be under-predicted (5).

4 | 438

OECD/OCDE

10. When used to identify chemicals that do not require classification for eye irritation and serious eye damage, the ICE test method has an overall accuracy of 88% (161/184), a false positive rate of 24% (20/83), and a false negative rate of 3% (3/101), when compared to in vivo rabbit eye test method data classified according to the UN GHS (4) (5). When test chemicals within certain classes (i.e., anti-fouling organic solvent containing paints) are excluded from the database, the accuracy of the ICE test method is 88% (159/181), the false positive rate 24% (20/83), and the false negative rate of 2% (2/99) for the UN GHS classification system (4).

11. The ICE test method is not recommended for the identification of test chemicals that should be classified as irritating to eyes (i.e., UN GHS Category 2 or Category 2A) or test chemicals that should be classified as mildly irritating to eyes (UN GHS Category 2B) due to the considerable number of UN GHS Category 1 chemicals underclassified as UN GHS Category 2, 2A or 2B and UN GHS No Category chemicals overclassified as UN GHS Category 2, 2A or 2B. For this purpose, further information and if needed, additional testing with another suitable method may be required.

12. All procedures with chicken eyes should follow applicable geographical regulations and the test facility's procedures for handling of human or animal-derived materials, which include, but are not limited to, tissues and tissue fluids. Universal laboratory precautions are recommended (21).

13. Whilst the ICE test method does not directly address conjunctival and iridial injuries as evaluated in the rabbit ocular irritancy test method, it addresses corneal effects which are the major driver of classification in vivo when considering the UN GHS Classification. In this respect, it should be noted that effects on the iris are of lesser importance for classification of chemicals according to UN GHS (8) (22). Also, although the reversibility of corneal lesions cannot be evaluated per se in the ICE test method, it has been shown that histopathological observations can help in identifying test chemicals causing irreversible effects not linked with initial high level injury such as those caused by non-extreme pH ($2 < \text{pH} < 11.5$) detergents (9). Finally, the ICE test method does not allow for an assessment of the potential for systemic toxicity associated with ocular exposure.

14. This Test Guideline will be updated periodically as new information and data are considered. For example, further histopathology data may become available for test chemicals other than non-extreme pH detergents and surfactants. To evaluate this possibility, users are encouraged to preserve eyes and prepare histopathology specimens that can be used to develop a database and decision criteria that may further improve the accuracy of this test method. The OECD has developed Guidance Document 160 to be considered when using the ICE and BCOP in vitro ocular toxicity test methods, which includes detailed procedures on the collection and processing of histopathology specimens for evaluation (12).

DEMONSTRATION OF PROFICIENCY

15. For any laboratory initially establishing the standard ICE test method, the proficiency chemicals provided in Annex 2 should be used. A laboratory can use these chemicals to demonstrate their technical competence in performing the standard ICE test method prior to submitting ICE data for regulatory hazard classification purposes. For any laboratory willing to establish ICE histopathology for the regulatory hazard classification of non-extreme pH detergents and surfactants, the ICE Atlas and recommendations provided within the revised OECD GD 160 should be used (12). Consolidated training, transferability and proficiency appraisal are recommended to ensure harmonized, consistent and reproducible histopathological observations. Furthermore, an internal pathology peer review should be conducted in accordance with current recommendations (23) and according to the OECD advisory document n. 16 on GLP requirements for peer review of histopathology (24), and as described in paragraph 50. Such peer review process allows to verify and improve the accuracy and quality of pathology diagnoses and interpretations. Finally, the proficiency chemicals provided in Annex 3 should be used for a laboratory to demonstrate technical competence in scoring the ICE histopathology effects, prior to submitting ICE histopathology data for the regulatory hazard classification of non-extreme pH detergents and surfactants.

PRINCIPLE OF THE TEST

16. The ICE test method is an organotypic model that provides short-term maintenance of the chicken eye in vitro. In this test method, damage by the test chemical is assessed by determination of corneal swelling, opacity, and fluorescein retention. Furthermore, histopathology can be used to increase the sensitivity of the method for identifying UN GHS Category 1 non-extreme pH ($2 < \text{pH} < 11.5$) detergents and surfactants (10). Whilst measurement of corneal swelling provides for a quantitative assessment, corneal opacity, fluorescein retention and histopathological changes each involve a qualitative assessment. Each measurement is either converted into a quantitative score used to assign an ICE Class (I to IV), or assigned a qualitative categorization that is used to assign an in vitro ocular hazard classification, either as UN GHS Category 1 or as UN GHS No Category (see Decision Criteria). However, no prediction can be made for chemicals not identified as UN GHS Category 1 or as UN GHS No Category with the ICE test method (see paragraph 11); in these cases, the “No prediction can be made” result of the ICE test would require additional information for classification purposes [see (7) for guidance].

Source and Age of Chicken Eyes

17. Historically, eyes collected from slaughterhouse chickens killed for human consumption have been used for this assay, eliminating the need for laboratory animals. Only the eyes of healthy animals considered suitable for entry into the human food chain are used.

18. Although a controlled study to evaluate the optimum chicken age has not been conducted, the age and weight of the chickens used historically in this test method are that of spring chickens traditionally processed by a poultry

slaughterhouse (i.e., approximately 7 weeks old, 1.5 - 2.5 kg).

Collection and Transport of Eyes to the Laboratory

19. Heads should be removed immediately after humane stunning of the chickens and incision of the neck for bleeding. Humane stunning methods include electrical stunning and controlled atmosphere stunning, as long as it can be shown not to adversely impact the quality of the chicken eyes (see paragraph 21). A local source of chickens close to the laboratory should be located so that their heads can be transferred from the slaughterhouse to the laboratory quickly enough to minimize deterioration and/or bacterial contamination. The time interval between collection of the chicken heads and placing the eyes in the superfusion chamber following enucleation should be minimized (typically within two hours) to assure meeting assay acceptance criteria. All eyes used in the assay should be from the same group of eyes collected on a specific day.

20. Since eyes are dissected in the laboratory, the intact heads are transported from the slaughterhouse at ambient temperature (typically between 18°C and 25°C) in plastic boxes humidified with tissues moistened with isotonic saline.

Selection Criteria and Number of Eyes Used in the ICE

21. Eyes that have high baseline fluorescein staining (i.e., > 0.5) or corneal opacity score (i.e., > 0.5) after they are enucleated are rejected.

22. Each treatment group and concurrent positive control consists of at least three eyes. The negative control group or the solvent control (if using a solvent other than saline) consists of at least one eye.

23. In the case of solid materials leading to a GHS No Category outcome, a second run of three eyes is recommended to confirm or discard the negative outcome.

PROCEDURE

Preparation of the Eyes

24. The eyelids are carefully excised, taking care not to damage the cornea. Corneal integrity is quickly assessed with a drop of 2% (w/v) sodium fluorescein applied to the corneal surface for a few seconds, and then rinsed with isotonic saline. Fluorescein-treated eyes are then examined with a slit-lamp microscope to ensure that the cornea is undamaged (i.e., fluorescein retention and corneal opacity scores ≤ 0.5).

25. If undamaged, the eye is further dissected from the skull, taking care not to damage the cornea. The eyeball is pulled from the orbit by holding the nictitating membrane firmly with surgical forceps, and the eye muscles are cut with a bent, blunt-tipped scissor. It is important to avoid causing corneal damage due to excessive pressure (i.e., compression artefacts).

26. When the eye is removed from the orbit, a visible portion of the optic nerve should be left attached. Once removed from the orbit, the eye is placed on

an absorbent pad and the nictitating membrane and other connective tissue are cut away.

27. The enucleated eye is mounted in a clamp (stainless steel or suitable alternative) with the cornea positioned vertically, and avoiding too much pressure on the eye by the clamp (due to the relatively firm sclera of the chicken eye-ball, only slight pressure is needed to fix the eye properly). The clamp is then transferred to a chamber of the superfusion apparatus (25). The clamps should be positioned in the superfusion apparatus such that the entire cornea is supplied with the isotonic saline drip (3-4 drops per minute or 0.1 to 0.15 mL/min). The chambers of the superfusion apparatus should be temperature controlled at $32 \pm 1.5^\circ\text{C}$. Annex 4 provides a diagram of a typical superfusion apparatus and the eye clamps, which can be obtained commercially or constructed. The apparatus can be modified to meet the needs of an individual laboratory (e.g., to accommodate a different number of eyes).

28. After being placed in the superfusion apparatus, the eyes are again examined with a slit-lamp microscope (e.g., Haag-Streit BP900) to ensure that they have not been damaged during the dissection procedure. Corneal thickness should also be measured at this time at the corneal apex using the depth measuring device on the slit-lamp microscope. Eyes with; (i), a fluorescein retention score of > 0.5 ; (ii) corneal opacity > 0.5 ; or, (iii), any additional signs of damage should be replaced. For eyes that are not rejected based on any of these criteria, individual eyes with a corneal thickness deviating more than 10% from the mean value for all eyes are to be rejected. For the Haag-Streit slit lamp BP900 fitted with depth-measuring device no. 1, the slit-width setting should be $9\frac{1}{2}$ equalling 0.095 mm. Alternatively the slit-lamp BQ900 from Haag-Streit may be used as long as it can be mounted with the depth measuring device and a slit width of 0.095 can be applied (see also paragraph 53). Users should be aware that slit-lamp microscopes could yield different corneal thickness measurements if the slit-width setting is different.

29. Once all eyes have been examined and approved, the eyes are incubated for approximately 45 to 60 minutes to equilibrate them to the test system prior to dosing. Following the equilibration period, a zero reference measurement is recorded for corneal thickness and opacity to serve as a baseline (i.e., time = 0). The fluorescein score determined at dissection is used as the baseline measurement for that endpoint.

Application of the Test Chemical

30. Immediately following the zero reference measurements, the eye (in its holder) is removed from the superfusion apparatus, placed in a horizontal position, and the test chemical is applied to the cornea.

31. Liquid test chemicals are typically tested undiluted, but may be diluted if deemed necessary (e.g., as part of the study design). The preferred solvent for dilution of test chemicals is physiological (isotonic) saline. However, alternative solvents may also be used under controlled conditions, but the appropriateness of solvents other than physiological saline should be demonstrated.

32. Liquid test chemicals are applied to the cornea such that the entire surface of the cornea is evenly covered with the test chemical; the standard volume is 0.03 mL.

33. If possible, solid test chemicals should be ground as finely as possible in a mortar and pestle, or comparable grinding tool. The powder is applied to the cornea such that the surface is uniformly covered with the test chemical; the standard amount is 0.03 g.

34. The test chemical (liquid or solid) is applied for 10 seconds and then rinsed from the eye with isotonic saline (approximately 20 mL) at ambient temperature. The eye (in its holder) is subsequently returned to the superfusion apparatus in the original upright position. In case of need, additional rinsing may be used after the 10-sec application and at subsequent time points (e.g., upon discovery of residues of test chemical on the cornea). In general the amount of saline additionally used for rinsing is not critical, but the observation of adherence of chemical to the cornea is important.

Control Chemicals

35. Concurrent negative or solvent/vehicle controls and positive controls should be included in each experiment.

36. When testing liquids at 100% or solids, physiological (isotonic) saline is used as the concurrent negative control in the ICE test method to detect non-specific changes in the test system, and to ensure that the assay conditions do not inappropriately result in an irritant response.

37. When testing diluted liquids, a concurrent solvent/vehicle control group is included in the test method to detect non-specific changes in the test system, and to ensure that the assay conditions do not inappropriately result in an irritant response. As stated in paragraph 31, only a solvent/vehicle that has been demonstrated to have no adverse effects on the test system can be used.

38. A known ocular irritant is included as a concurrent positive control in each experiment to verify that an appropriate response is induced. As the ICE test method is being used in this Test Guideline to identify chemicals inducing serious eye damage, the positive control should be a reference chemical inducing responses that fulfil the criteria for classification as UN GHS Category 1 in this test method. However, to ensure that variability in the positive control response across time can be assessed, the magnitude of the severe response should not be excessive. Sufficient in vitro data for the positive control should be generated such that a statistically defined acceptable range for the positive control can be calculated. If adequate historical ICE test method data are not available for a particular positive control, studies may need to be conducted to provide this information.

39. Examples of positive controls for liquid test chemicals are 10% acetic acid or 5% benzalkonium chloride, while examples of positive controls for solid test chemicals are sodium hydroxide or imidazole.

40. Benchmark chemicals are useful for evaluating the ocular irritancy potential of unknown chemicals of a specific chemical or product class, or for

evaluating the relative irritancy potential of an ocular irritant within a specific range of irritant responses.

Endpoints Measured

41. Treated corneas are evaluated prior to treatment and at 30, 75, 120, 180, and 240 minutes (± 5 minutes) after the post-treatment rinse. These time points provide an adequate number of measurements over the four-hour observation period, while leaving sufficient time between measurements for the requisite observations to be made for all eyes.

42. The endpoints evaluated are corneal opacity, swelling, fluorescein retention, and morphological effects (e.g., pitting or loosening of the epithelium). All of the endpoints, with the exception of fluorescein retention (which is determined only prior to treatment and 30 minutes after test chemical exposure) are determined at each of the above time points.

43. Photographs are advisable to document corneal opacity, fluorescein retention, morphological effects and, if conducted, histopathology.

44. After the final examination at four hours, users are encouraged to preserve eyes in an appropriate fixative (e.g., neutral buffered formalin) for possible histopathological examination in particular for non-extreme pH ($2 < \text{pH} < 11.5$) detergents and surfactants (see paragraphs 7, 14 and 56). If histopathology is conducted, eyes should be fixed, trimmed, embedded in paraffin wax, sectioned and stained according to the procedures described for the collection and processing of histopathology specimens within the OECD GD 160 (12).

45. Corneal swelling is determined from corneal thickness measurements made with an optical pachymeter on a slit-lamp microscope. It is expressed as a percentage and is calculated from corneal thickness measurements according to the following formula:

$$\left(\frac{\text{corneal thickness at time } t - \text{corneal thickness at time } = 0}{\text{corneal thickness at time } = 0} \right) \times 100$$

46. The mean percentage of corneal swelling for all test eyes is calculated for all observation time points. Based on the highest mean score for corneal swelling, as observed at any time point, an ICE Class is assigned for each test chemical (see paragraph 53).

47. Corneal opacity is evaluated by using the area of the cornea that is most densely opacified for scoring according to the observations described in Table 1. The mean corneal opacity value for all test eyes is calculated for all observation time points. Based on the highest mean score for corneal opacity, as observed at any time point, an ICE class is assigned for each test chemical (see paragraph 53).

Table 1. Corneal opacity scores

Score	Observation
0	No opacity
0.5	Very faint opacity
1	Scattered or diffuse areas; details of the iris are clearly visible
2	Easily discernible translucent area; details of the iris are slightly obscured
3	Severe corneal opacity; no specific details of the iris are visible; size of the pupil is barely discernible
4	Complete corneal opacity; iris invisible

48. Fluorescein retention is evaluated at the 30 minute observation time point only according to the scores shown in Table 2. The mean fluorescein retention value of all test eyes is then calculated for the 30-minute observation time point, and used to assign an ICE class for each test chemical (see paragraph 53).

Table 2. Fluorescein retention scores

Score	Observation
0	No fluorescein retention
0.5	Very minor single cell staining
1	Single cell staining scattered throughout the treated area of the cornea
2	Focal or confluent dense single cell staining
3	Confluent large areas of the cornea retaining fluorescein

49. Morphological effects include “pitting” of corneal epithelium, “loosening” of epithelium, “roughening” of the corneal surface and “sticking” of the test chemical to the cornea. These findings can vary in severity and may occur simultaneously. The classification of these findings is subjective according to the interpretation of the investigator.

50. If histopathology is conducted, the semi-quantitative scoring system described in Table 3 should be used. It is critical to distinguish, for example regarding epithelial vacuolation effects, the treatment-related effects from histopathological artefacts and/or background morphology. For this purpose the Atlas presented in Annex II of the OECD GD 160 should be carefully consulted (12). Furthermore, original slides (rather than photomicrographs) need to be used as some effects require a three-dimensional evaluation of the tissues. Only effects that are observed should be scored. No assumptions should be made (e.g., if the top layer of the epithelium is missing it will not be possible to score for vacuolation in that layer). Furthermore, effects/changes close to the limbus should be scored if the tissue architecture was preserved. However, effects/changes occurring within the limbus should not be scored due to effects not linked to the chemical exposure. An internal pathology peer review system should be conducted in accordance with current recommendations (23) and according to the

OECD/OCDE**438** | 11

OECD advisory document n. 16 on GLP requirements for peer review of histopathology (24). In this process, a pathologist (with expertise on the tissues to be evaluated) peer-reviews a number of slides and pathology data (e.g., 1 out of 3 eyes) to assist the study pathologist in refining pathology diagnoses and interpretations. Such peer review process allows to verify and improve the accuracy and quality of pathology diagnoses and interpretations. Finally, consolidated training, transferability and proficiency appraisal are recommended to ensure consistent histopathological observations.

Table 3. Semi-quantitative histopathological scoring system used for isolated chicken eyes that were fixed, trimmed, embedded in paraffin wax, sectioned and stained

Parameter	Observation	Score	Description*
Epithelium: erosion	Very slight	½	Few single cells up to the entire single superficial layer
	Slight	1	Up to 3 layers are gone
	Moderate	2	Up to 50 % of the epithelial layer is gone*
	Severe	3	Epithelial layer is gone up to the basement membrane
Epithelium: vacuolation <i>Separately scored for the top, mid, and lower parts of the epithelium</i>	Very slight	½	Single to few scattered cells
	Slight	1	Groups of vacuolated cells or single string of cells with small vacuoles
	Moderate	2	Up to 50% of the epithelium consists of vacuolated cells*
	Severe	3	50 – 100% of the epithelium consists of vacuolated cells
Epithelium:necrosis***	Normal	-	< 10 necrotic cells†
	Very slight	½	10 – 20 necrotic cells†
	Slight	1	20 – 40 necrotic cells†
	Moderate	2	Many necrotic cells but < 50% of the epithelial layer
	Severe	3	50 – 100% of the epithelial layer is necrotic.
Stroma: pyknotic nuclei **:+++ <i>In top or bottom region</i>	Normal	-	< 5 pyknotic nuclei
	Slight	1	5-10 pyknotic nuclei
	Moderate	2	> 10 pyknotic nuclei
Stromal disorder of fibres ***	Present	P	Irregular appearance of the fibres.
Endothelium:necrosis	Present	P	The endothelium consists of only one layer, so a grade is not relevant

Notes: Annex II of the OECD GD 160 (12) displays an Atlas with typical photomicrographs of untreated as well as treated Isolated Chicken Eyes illustrating the various possible histopathological effects described above.

*Over the entire cornea except in case of test chemicals (e.g. some solid chemicals) causing localized effects despite of the homogenous application of the test chemical as required within the OECD TG 438. In this case the evaluation should be based on the localized effects at the site(s) of exposure.

***Top, mid and lower parts represent equal one third parts of the epithelial layer each. If the top layer is missing, the mid layer does not become the 'new' top layer, but is still the mid layer (see Annex II of the OECD GD 160 for more details (12)).

*** Only necrosis of attached cells/tissues.

† Necrotic cells are counted across the entire length of the cornea (there is no need for a specific fixed length to report cell counts because the entire length of the cornea is consistent on each slide as there is almost no variation in the size of the chicken eyes used and in the size of the samples evaluated microscopically). The scoring system uses absolute cell counts from 'normal' to 'slight', versus a percentage for 'moderate' and 'severe'. This is due to the way the evaluation is performed by the examiner: necrotic cells are seen as individual items. If there are more, they are usually scattered. Therefore the examiner counts them to get an impression of the amount of necrosis. This is in contrast to erosion, for which the first effect the examiner notices is that a part of the epithelium is missing, so it makes sense to use an estimated percentage of loss.

†† The ICE test method already includes a precise measurement of the thickness of the cornea using a slit lamp microscope. Therefore, swelling of the stroma is not separately scored during the subsequent histopathological evaluation.

††† The stromal effects that are scored consist of (1) pyknotic nuclei, which originate from the scoring system used by Maurer (2001) based on his observations in corneas of rabbits after *in vivo* exposure (described as keratocyte loss/necrosis), and of (2) disorder of fibres. Regarding (1), the presence of pyknotic nuclei is observed only occasionally and the development of pyknotic nuclei is proposed to be dependent on the depth of injury and/or the inflammation process of the cornea (*in vivo*). Furthermore, due to the elongated form of the stromal fibroblasts, normal nuclei could be misleadingly considered as pyknotic nuclei depending on the section orientation of cells. Regarding (2), the observation and scoring of disorder of fibres may be difficult because the stromal fibres already show a "natural" disorder. The processing of the cornea for microscopy can also contribute to an artificial disorder of stromal fibres. In both cases (pyknotic nuclei and disorder of fibres), these observations coincide with severe corneal effects already observed by the slit-lamp microscope observations, and with effects observed in the mid and/or lower epithelial layer.

52. The OECD TG 438 requires test chemicals to be homogeneously distributed on the surface of the treated eyes. Based on such exposure, test chemicals usually cause homogenous effects in the cornea of the isolated chicken eyes, and the mean of histopathological effects over the entire slide should be scored. However, some test chemicals may cause focal or multifocal effects confined to certain spots despite their homogenous application (e.g., as for some solid test chemicals). If (multi)focal effects are observed during the performance of the ICE test method, the histopathologist should be informed and the histopathological scoring should be conducted based on the localized adverse effects observed where exposure to the test chemical occurred. Furthermore, if doubts remain (e.g. a discrepancy between the ICE results and the histopathological observations is noticed), additional slices may be prepared on other parts of the cornea to ensure the localized effects are present in the observed section.

DATA AND REPORTING

Data Evaluation

53. Results from corneal opacity, swelling and fluorescein retention should be evaluated separately to generate an ICE class for each endpoint. The ICE classes for each endpoint are then combined to predict the In Vitro Classification of each test chemical. Similarly, histopathology evaluation, if applicable, should be conducted separately and considered according to paragraphs 55 and 56.

Decision Criteria

54. Once each endpoint has been evaluated, ICE classes can be assigned based on a predetermined range. Interpretation of corneal swelling (Table 4), opacity (Table 5), and fluorescein retention (Table 6) using four ICE classes is

done according to the scales shown below. It is important to note that the corneal swelling scores shown in Table 4 are only applicable if thickness is measured with a Haag-Streit BP900 slit-lamp microscope (or alternatively a Haag-Streit BQ900 slit-lamp microscope) with depth-measuring device no. 1 and slit-width setting at 9½, equalling 0.095 mm. Users should be aware that slit-lamp microscopes could yield different corneal thickness measurements if the slit-width setting is different.

Table 4. ICE classification criteria for corneal swelling

Mean Corneal Swelling (%)*	ICE Class
0 to 5	I
>5 to 12	II
>12 to 18 (>75 min after treatment)	II
>12 to 18 (≦75 min after treatment)	III
>18 to 26	III
>26 to 32 (>75 min after treatment)	III
>26 to 32 (≦75 min after treatment)	IV
>32	IV

Note: Highest mean score observed at any time point.

Table 5. ICE classification criteria for opacity.

Maximum Mean Opacity Score*	ICE Class
0.0-0.5	I
0.6-1.5	II
1.6-2.5	III
2.6-4.0	IV

Note: *Maximum mean score observed at any time point (based on opacity scores as defined in Table 1). *Based on scores as defined in Table 2.

Table 6. ICE classification criteria for mean fluorescein retention.

Mean Fluorescein Retention Score at 30 minutes post-treatment*	ICE Class
0.0-0.5	I
0.6-1.5	II
1.6-2.5	III
2.6-3.0	IV

Note: Based on scores as defined in Table 2.

55. The *in vitro* classification for a test chemical is assessed by reading the UN GHS classification that corresponds to the combination of categories obtained for corneal swelling, corneal opacity, and fluorescein retention as described in Table 7.

Table 7. Overall *in vitro* classifications

UN GHS Classification	Combinations of the 3 Endpoints
No Category	3 x I
	2 x I, 1 x II
	2 x II, 1 x I
No prediction can be made	Other combinations
Category 1	3 x IV
	2 x IV, 1 x III
	2 x IV, 1 x II*
	2 x IV, 1 x I*
	Corneal opacity = 3 at 30 min (in at least 2 eyes)
	Corneal opacity = 4 at any time point (in at least 2 eyes) Severe loosening of the epithelium (in at least 1 eye)

Note: Combinations less likely to occur.

56. If histopathology is used for non-extreme pH ($2 < \text{pH} < 11.5$) detergents and surfactants, the decision criteria shown in Table 8 should be used. In addition, in case stromal pyknotic nuclei scores \geq slight (score 1) in at least 2 out of 3 eyes are observed; or any endothelium effects are observed in at least 2 out of 3 eyes, such effects should be noted as observations to give indication on the severity of effects.

Table 8. Histopathology decision criteria to be used in addition to the standard validated ICE test method for the identification of UN GHS Category 1 non-extreme pH ($2 < \text{pH} < 11.5$) detergents and surfactants

Tissue layer	Effects triggering eye serious damage (GHS Category 1) identification
Epithelium	<ul style="list-style-type: none"> - erosion = moderate (score 2) in at least 2 out of 3 eyes - and/or, any vacuolation (= very slight, score ½) observed in the mid and/or lower parts in at least 2 out of 3 eyes - or, if erosion = moderate (score 2) in 1 out of 3 eyes + vacuolation = very slight in mid and/or low part (score ½) is observed in at least another eye out of the 3 eyes - and/or, necrosis = moderate (score 2) observed in at least 2 out of 3 eyes

57. Furthermore, the prediction model shown in table 9 should be used. The ICE histopathology criteria and the prediction model described in Tables 8 and 9,

respectively are applicable only to identify UN GHS Category 1 non-extreme pH ($2 < \text{pH} < 11.5$) detergents and surfactants.

Table 9. Prediction model for identification of non-extreme pH ($2 < \text{pH} < 11.5$) detergents and surfactants based on ICE histopathology evaluations

Standard ICE	ICE histopathology criteria described in Table 8	UN GHS Classification
No prediction can be made	Criteria met	UN GHS Category 1
	Criteria not met	No prediction can be made

Study Acceptance Criteria

58. A test is considered acceptable if the concurrent negative or vehicle/solvent controls and the concurrent positive controls are identified as GHS Non-Classified and GHS Category 1, respectively.

Test Report

59. The test report should include the following information, if 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 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;
- Treatment of the test/control chemical prior to testing, if applicable (e.g. warming, grinding);
- Storage conditions and stability to the extent available;

Information Concerning the Sponsor and the Test Facility

- Name and address of the sponsor, test facility and study director, where applicable, the study pathologist;
- Identification on the source of the eyes (e.g., the facility from which they were collected);

Test Method Conditions

- Description of test system used;
- Slit-lamp microscope and pachymeter used (e.g., model) and the instrument settings used;
- Reference to historical negative and positive control results and, if applicable, historical data demonstrating acceptable concurrent benchmark control ranges;
- The procedure used to ensure the integrity (i.e., accuracy and reliability) of the test method over time (e.g., periodic testing of proficiency chemicals));
- The procedure used for tissues fixation in case histopathology is performed.

Eyes Collection and Preparation

- Age and weight of the donor animal and if available, other specific characteristics of the animals from which the eyes were collected (e.g. sex, strain);
- Storage and transport conditions of eyes (e.g., date and time of eye collection, time interval between collection of chicken heads and placing the enucleated eyes in superfusion chamber);
- Preparation & mounting of the eyes including statements regarding their quality, temperature of eye chambers, and criteria for selection of eyes used for testing.

Test Procedure

- Number of replicates used;
- Identity of the negative and positive controls used (if applicable, also the solvent and benchmark controls);
- Test chemical dose, application and exposure time used;
- Observation time points (pre- and post- treatment);
- Description of evaluation and decision criteria used including for histopathology if applicable;
- Peer-review system used for histopathological observations, if applicable;
- Description of study acceptance criteria used;
- Description of any modifications of the test procedure.
- Furthermore, if not included in the e.g. standard operating procedure (SOP), when available, the following information shall be included:
- Description of consolidated training and transferability;
- Fixative, dehydration and clarifying agents, and protocols used;
- Embedding material, infiltration solvents, and concentrations used;
- Thickness of tissue sections;
- Stain (in report) and the associated staining protocol used;
- Information on instruments used;

Results

- Tabulation of corneal swelling, opacity and fluorescein retention scores obtained for each individual eye and at each observation time point, including the mean scores at each observation time of all tested eyes;
- Description of any morphological effects observed;
- The highest mean corneal swelling, opacity and fluorescein retention scores observed (from any time point), and its relating ICE class.;
- Tabulation of histopathological semi-quantitative scoring observations and derived conclusions if applicable;
- If applicable, indication of use of localized effects for histopathological scoring;
- Description of any other effects observed;
- The derived in vitro GHS classification;
- If appropriate, photographs of the treated and control eyes
- If applicable, optional digital images or digital slide scans of the histopathology specimens;

Discussion of the Results.

Conclusion.

Literature

- (1) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report - In Vitro Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmter.htm]
- (2) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic in vitro assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. Available at: [<http://ecvam.jrc.it/index.htm>].
- (3) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report – Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Mild/Moderate Ocular Irritants: The Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 10-7553A. Available at: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm>]
- (4) 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.pdf].
- (5) OECD (2018). Streamlined Summary Document Supporting OECD Test Guideline 438 on the Isolated Chicken Eye for Eye Irritation/Corrosion. Series on Testing and Assessment No 188. ENV Publications, OECD, Paris.

OECD/OCDE

438 | 19

- (6) OECD (2018). Test Guideline 492. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage. 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.
- (7) 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.
- (8) 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., Zuang V. (2014). Draize test for serious eye damage / eye irritation: importance of the endpoints evaluated with regard to UN GHS / EU CLP classification. *Archives of Toxicology* 88, 701-723.
- (9) Cazelle E., Eskes C., Hermann M., Jones P., McNamee P., Prinsen M., Taylor H., Wijnands M.V.W. (2014). Suitability of histopathology as an additional endpoint to the isolated chicken eye test for classification of non-extreme pH detergent and cleaning products. *Toxicology In Vitro* 28, 657-666.
- (10) Reproducibility and predictive capacity of the Isolated Chicken Eye Test for the identification of non-extreme pH detergents and surfactants causing serious eye damage. Manuscript in preparation
- (11) Scott L, Eskes C, Hoffman S, Adriaens E, Alepee N, Bufo M, Clothier R, Facchini D, Fallar 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.
- (12) OECD (2018) Guidance Document on “The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-Severe Irritants. Series on Testing and Assessment No. 160. **Error! Hyperlink reference not valid.** Available at: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (13) Prinsen, M.K. and Koëter, B.W.M. (1993). Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. *Fd. Chem. Toxicol.* 31, 69-76.
- (14) DB-ALM (INVTITOX) (2009). Protocol 80: Chicken enucleated eye test (CEET) / Isolated Chicken Eye Test, 13pp. Available at: [<http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>].
- (15) Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. and Spielmann H. (1995). The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicol. In Vitro* 9, 871-929.

- (16) Prinsen, M.K. (1996). The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. *Food Chem. Toxicol.* 34, 291-296.
- (17) Chamberlain, M., Gad, S.C., Gautheron, P. and Prinsen, M.K. (1997). IRAG Working Group I: Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation. *Food Chem. Toxicol.* 35, 23-37.
- (18) ICCVAM. (2006). Background review document: Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method. NIH Publication No.: 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm]
- (19) Cazelle E., Eskes C., Hermann M., Jones P., McNamee P., Prinsen M., Taylor H., Wijnands M.V.W. (2015). Suitability of the Isolated Chicken Eye Test for Classification of Extreme pH Detergents and Cleaning Products. *Toxicology In Vitro* 29, 609-616.
- (20) Prinsen, M.K. (2006). The Draize Eye Test and in vitro alternatives; a left-handed marriage? *Toxicology in Vitro* 20,78-81.
- (21) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Available at: [<http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf>].
- (22) 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.
- (23) Morton D., Sellers R.S., Barale-Thomas E., Bolon B., George C., Hardisty J.F., Irizarry A., McKay J.S., Odin M., Teranishi M. (2010). Recommendations for Pathology Peer Review. *Toxicol. Pathol.* 38, 1118-1127.
- (24) OECD (2014). Advisory document n. 16. Guidance on the good laboratory practice (GLP) Requirements for Peer Review of Histopathology. OECD Series on principles of good laboratory practice and compliance monitoring. Advisory document of the working group on GLP. [ENV/JM/MONO\(2014\)30](http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdseriesonprinciplesofgoodlaboratorypracticeglpandcompliancemonitoring.htm). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdseriesonprinciplesofgoodlaboratorypracticeglpandcompliancemonitoring.htm>.
- (25) Burton, A.B.G., M. York and R.S. Lawrence (1981). The in vitro assessment of severe irritants. *Fd. Cosmet. Toxicol.* 19, 471-480.
- (26) 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.

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.

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).

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

Corneal opacity: Measurement of the extent of opaqueness of the cornea following exposure to a test chemical. Increased corneal opacity is indicative of damage to the cornea.

Corneal swelling: An objective measurement in the ICE test of the extent of distension of the cornea following exposure to a test chemical. It is expressed as a percentage and is calculated from baseline (pre-dose) corneal thickness measurements and the thickness recorded at regular intervals after exposure to the test material in the ICE test. The degree of corneal swelling is indicative of damage to the cornea.

Detergents: a mixture (excluding dilutions of single surfactant) containing one or more surfactants at a final concentration of > 3%, intended for washing and cleaning processes. Detergents may be in any form (liquid, powder, paste, bar, cake, moulded piece, shape, etc.) and marketed for or used in household, or institutional or industrial purposes.

Eye Irritation: Production of changes in the eye following the application of test chemical to the anterior surface of the eye, which are fully reversible within 21 days of application. Interchangeable with "Reversible effects on the Eye" and with "UN GHS Category 2" (4).

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.

Fluorescein retention: A subjective measurement in the ICE test of the extent of fluorescein sodium that is retained by epithelial cells in the cornea following exposure to a test chemical. The degree of fluorescein retention is indicative of damage to the corneal epithelium.

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.

IATA: Integrated Approach on Testing and Assessment.

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

Mixture: A mixture or a solution composed of two or more substances in which they do not react (4).

Negative control: An untreated replicate containing all components of a test system. This sample is processed with test chemical-treated samples and other control samples to determine whether the solvent interacts with the test system.

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

Positive control: A replicate containing all components of a test system and treated with a chemical known to induce a positive response. To ensure that variability in the positive control response across time can be assessed, the magnitude of the severe response should not be excessive.

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.

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

Serious eye damage: Production of tissue damage in the eye, or serious physical decay of vision, following application of a test chemical to the anterior surface of the eye, which is not fully reversible within 21 days of application. Interchangeable with "Irreversible effects on the eye" and with "UN GHS Category 1" (4).

Slit-lamp microscope: An instrument used to directly examine the eye under the magnification of a binocular microscope by creating a stereoscopic, erect image. In the ICE test method, this instrument is used to view the anterior structures of the chicken eye as well as to objectively measure corneal thickness with a depth-measuring device attachment.

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.

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 (4).

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).

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.

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 (4).

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 test method: A test method for which validation studies have been completed to determine the relevance (including accuracy) and reliability for a specific purpose. It is important to note that a validated test method may not have sufficient performance in terms of accuracy and reliability to be found acceptable for the proposed purpose.

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 2: PROFICIENCY CHEMICALS FOR THE ICE 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 13 chemicals recommended in Table 10. The ICE outcomes provided represent examples of the range of responses observed during the evaluation studies and that may be expected (5)(18). These chemicals were selected to represent the range of responses for eye hazards based on results from the in vivo rabbit eye test (TG 405) and the UN GHS classification system (i.e., UN GHS Categories 1, 2A, 2B, or No Category) (4)(26). Other selection criteria were, to the extent possible that these chemicals produced reproducible results in the ICE test method, are commercially available and have high quality in vivo reference data available. Reference data are available in the SSD (5). 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 evaluation and validation of the ICE test method could be used (5) (18). Such deviations should however be justified.

Table 10. Recommended chemicals for demonstrating technical proficiency with ICE

Chemical	CASRN	Chemical Class ¹	Physical Form	In Vivo UN GHS Classification ²	ICE UN GHS Classification ^{3,4}
Benzalkonium chloride (10%)	8001-54-5	Onium compound	Liquid	Category 1	Category 1
Chlorhexidine	55-56-1	Amine, amidine	Solid	Category 1	Category 1
Sodium hydroxide (10%)	1310-73-2	Alkali	Liquid	Category 1	Category 1
Imidazole	288-32-4	Heterocyclic	Solid	Category 1	Category 1
Trichloroacetic acid (30%)	76-03-9	Carboxylic acid	Liquid	Category 1	Category 1
2,6-Dichlorobenzoyl chloride	4659-45-4	Acyl halide	Liquid	Category 2A	No predictions can be made ⁴
Ammonium nitrate	6484-52-2	Inorganic salt	Solid	Category 2A ⁵	No predictions can be made ⁴
Sodium hydroxide (1%)	1310-73-2	Alkali	Liquid	Category 2B	No predictions can be made ⁴
Dimethyl sulfoxide	67-68-5	Organic sulphur compound	Liquid	No Category	No Category
Ethyl trimethyl acetate	3938-95-2	Ester	Liquid	No Category	No Category
Methylcyclopentane	96-37-7	Hydrocarbon (cyclic)	Liquid	No Category	No Category
n-Hexane	110-54-3	Hydrocarbon (acyclic)	Liquid	No Category	No Category
Triacetin	102-76-1	Lipid	Liquid	No Category	No Category

Abbreviations: CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number; ICE: Isolated Chicken Eye test; n.a.: not available; UN GHS = United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (4).

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

²Based on results from the *in vivo* rabbit eye test (OECD TG 405) and using the UN GHS (4)(26).

³Based on results in ICE as described in table 7.

⁴Combination of ICE scores other than the ones described in table 6 for the identification of GHS no-category and GHS Category 1 (see table 7)

⁵Classification as 2A or 2B depends on the interpretation of the UN GHS criterion for distinguishing between these two categories, *i.e.* 1 out of 3 vs. 2 out of 3 animals with effects at day 7 necessary to generate a Category 2A classification. The *in vivo* study included 3 animals. All endpoints apart from conjunctiva redness in one animal recovered to a score of zero by day 7 or earlier. The one animal that did not fully recover by day 7 had a conjunctiva redness score of 1 (at day 7) that fully recovered at day 10.

ANNEX 3: PROFICIENCY CHEMICALS FOR THE ICE HISTOPATHOLOGY TO BE USED IN ADDITION TO THE STANDARD ICE TEST METHOD FOR THE LIMITED APPLICABILITY DOMAIN OF NON-EXTREME PH (2 < PH < 11.5) DETERGENTS AND SURFACTANTS

Prior to routine use of ICE histopathology in addition to the standard ICE test method for the limited use domain of non-extreme pH (2 < pH < 11.5) detergents and surfactants, laboratories should demonstrate technical proficiency by correctly identifying the eye hazard classification of the 6 chemicals recommended in Table 11. These chemicals were selected to represent the range of responses for eye hazards based on results from the in vivo rabbit eye test (TG 405) and the UN GHS classification system (i.e., UN GHS Categories 1, 2, or No Category) (4)/(26). Other selection criteria were, to the extent possible that these chemicals produced reproducible results in the ICE histopathology, are commercially available and have high quality in vivo data available. 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 evaluation of the ICE histopathology could be used (10). Such deviations should however be justified.

Abbreviations: CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number; NPCM:

OECD/OCDE 438 | 27

Table 11. Recommended chemicals for demonstrating technical proficiency with ICE histopathology

Chemical	CASRN	Surfactant type	Physical Form	<i>In Vivo</i> Classification ¹	Standard ICE UN GHS classification ²	ICE Histopathology UN GHS classification ³
Benzalkonium chloride (5%)	8001-54-5	Cationic	Liquid	Category 1	Category 1	Category 1 (erosion) in 3 out of 3 laboratories
Benzensulphonylchloride	98-09-9	Anionic	Liquid	Category 1	Category 1	Category 1 (necrosis and vacuolation) in 3 out of 3 laboratories
Cetylpyridinium bromide (10%)	140-72-7	Cationic	Liquid	Category 1	No predictions can be made	Category 1 (vacuolation) in 3 out of 3 laboratories
Cetylpyridinium bromide (1%)	140-72-7	Cationic	Liquid	Category 2A	No predictions can be made	No predictions can be made in 3 out of 3 laboratories
N-Lauroyl sarcosine Na salt (10%)	137-16-6	Anionic	Liquid	Category 2A	No predictions can be made	No predictions can be made in 3 out of 3 laboratories
Cetylpyridinium bromide (0.1%)	140-72-7	Cationic	Liquid	No Category	No predictions can be made	No predictions can be made in 3 out of 3 laboratories

Abbreviations: CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number; NPCM: No Prediction Can Be Made

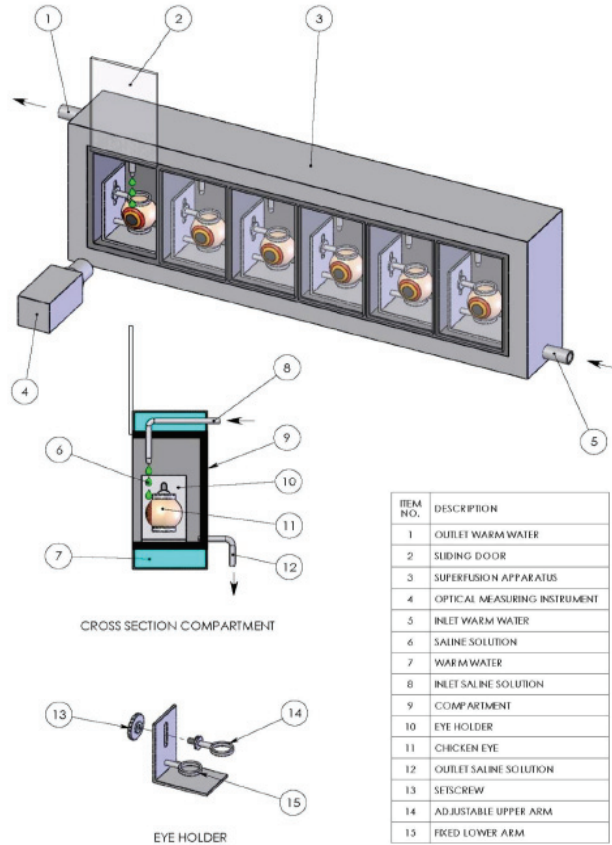
¹Based on results from the *in vivo* rabbit eye test (OECD TG 405) and using the UN GHS (4)(26).

²Based on results in ICE as described in table 7.

³Based on ICE histopathology criteria as described in tables 8 and 9 and within the revised OECD GD 160 (12).

ANNEX 4

Figure 1. Diagrams of the ice superfusion apparatus and eye clamps



Note: See (25) for additional generic descriptions of the superfusion apparatus and eye clamp.

“화장품 등 안자극 동물대체시험법(닭의 안구를 이용한 안점막자극 시험법) 가이드라인(민원인 안내서)”

발 행 일 2021년 8월
발 행 인 식품의약품안전평가원장 서경원
편집위원장 독성평가연구부장 정자영
편 집 위 원 윤혜성, 김광진, 윤소영, 강남희, 이정선, 이용선, 전해련, 차민희
도움주신분 정태천(영남대학교), 김배환(계명대학교), 조선아(아모레퍼시픽)
문 의 처 식품의약품안전평가원, 특수독성과
Tel : 043-719-5153, 5155 Fax : 043-719-5150
주 소 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명 2로 187,
오송보건의료행정타운 식품의약품안전처 식품의약품안전평가원

공익신고자 보호제도란?

- 공익신고자등(친족 또는 동거인 포함)이 공익신고등으로 인하여 피해를 받지 않도록 **비밀보장**, **불이익보호조치**, **신변보호조치** 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

