

[별표 12] <개정 2020.12.10.>

인축 독성 시험기준과 방법(제5조제1항제3호 관련)

## 12-1. 화학농약 및 생화학농약

### **12-1-1. <삭제 2018.12.17.>**

- 12-1-1-1. <삭제 2018.12.17.>
- 12-1-1-2. <삭제 2018.12.17.>
- 12-1-1-2-1. <삭제 2018.12.17.>
- 12-1-1-2-2. <삭제 2018.12.17.>
- 12-1-1-2-3. <삭제 2018.12.17.>
- 12-1-1-2-4. <삭제 2018.12.17.>
- 12-1-1-3. <삭제 2018.12.17.>
- 12-1-1-4. <삭제 2018.12.17.>
- 12-1-1-4-1. <삭제 2018.12.17.>
- 12-1-1-4-1-1. <삭제 2018.12.17.>
- 12-1-1-4-1-2. <삭제 2018.12.17.>
- 12-1-1-4-1-3. <삭제 2018.12.17.>
- 12-1-1-4-2. <삭제 2018.12.17.>
- 12-1-1-4-3. <삭제 2018.12.17.>
- 12-1-1-5. <삭제 2018.12.17.>
- 12-1-1-6. <삭제 2018.12.17.>
- 12-1-1-7. <삭제 2018.12.17.>
- 12-1-1-7-1. <삭제 2018.12.17.>
- 12-1-1-7-2. <삭제 2018.12.17.>
- 12-1-1-7-3. <삭제 2018.12.17.>
- 12-1-1-8. <삭제 2018.12.17.>

### **12-1-2. 급성경피독성시험**

12-1-2-1. 시험농약 : 제품 또는 원제

12-1-2-2. 시험동물

12-1-2-2-1. 동물종 및 계통 : 랫드(SPF 동물)의 사용을 원칙으로 하되 일반적

으로 독성시험에 광범위하게 사용되는 계통을 선정한다. 랫드 이외의 다른 포유동물종을 사용하였을 경우에는 그 선정 이유를 명기하여야 한다.

12-1-2-2-2. 연령 : 급성경구독성시험에 준함.

12-1-2-2-3. 성별 : 급성경구독성시험에 준함.

12-1-2-2-3. 시험동물수 : 급성경구독성시험에 준함.

12-1-2-3. 대조군 설정 : 급성경구독성시험에 준함.

12-1-2-4. 시험 약량 수준 설정 및 약제의 조제

12-1-2-4-1. 시험 약량 수준(dose levels and selection)

12-1-2-4-1-1. 기초시험은 시험농약이 고상인 경우는 2,000 mg/kg(체중), 액상인 경우는 4,000mg/kg(체중)을 처리하되 약제의 특성상 처리가 불가능할 경우에는 처리약량을 감량하며, 시험결과 시험동물의 치사율이 50%미만인 경우에는 그 이상의 시험 수준 설정은 생략한다.

12-1-2-4-1-2. 예비 및 본시험 : 급성경구독성시험에 준함.

12-1-2-4-1-3. 약제의 특성 및 문헌정보에 따라 기초시험 및 예비시험을 생략하고 본시험을 실시할 수도 있다.

12-1-2-4-2. 용매(vehicle)의 선택 : 급성경구독성시험에 준함.

12-1-2-5. 처리방법

12-1-2-5-1. 체모제거 : 시험개시전에 약제처리를 위한 시험동물 등부위의 체모를 가급적 넓게 삭발하되 피부가 손상되지 않도록 주의한다.

12-1-2-5-2. 처리방법 : 약제처리면적은 체표면적이 10%정도(랫드 4cm×4cm 토끼 12cm×14cm) 로 하고 시험약제가 액상인 경우는 원액 또는 조제한 액을 바르고 고상인 경우에는 연고상으로 하여 균일하게 바른 다음 시험농약의 유실을 방지하기 위하여 비자극성 테이프로 24시간 고정시켜 준다.

12-1-2-5-3. 처리약제의 제거

12-1-2-6. 관찰기간 : 급성경구독성시험에 준함.

12-1-2-7. 관찰항목 : 급성경구독성시험에 준함.

12-1-2-8. 반수치사약량(LD<sub>50</sub>) 산출 : 급성경구독성시험에 준함.

### **12-1-3. 급성흡입독성시험**

12-1-3-1. 시험농약 : 원제 및 제품농약으로서 약제 특성상 고휘발성 약제, 기타 흡입으로 인한 위해 가능성이 있는 약제

12-1-3-2. 시험동물

- 12-1-3-2-1. 시험동물 : 랫드(SPF 동물)의 사용을 원칙으로 하되 일반적으로 독성시험에 광범위하게 사용되는 계통을 선정한다. 랫드 이외의 다른 포유동물을 사용하였을 경우에는 그 선정 이유를 밝혀야 한다.
- 12-1-3-2-1. 연령 : 건강하고 성숙된 동물로서 임신 및 출산경험이 없는 개체를 선발하되 성별로 생후 5-7주령의 균일한 개체를 사용한다.
- 12-1-3-2-2. 성별 : 처리농도 수준별 암수 같은 비율로 시험하되 성별간에 독성 발현의 차이가 현저하게 나타날 경우에는 암·수별로 구분 시험한다.
- 12-1-3-3. 처리농도 수준 및 동물수
- 12-1-3-3-1. 처리농도 수준 및 동물수
- 12-1-3-3-1-1. 기초시험 : 처리농도 수준은 1개 수준을 설정하며 동물의 수는 10마리를 사용한다.
- 12-1-3-3-1-2. 예비시험 및 본시험 : 처리농도 수준은 3~7개 단계 범위 내에서 설정하며 수준당 동물의 수는 10마리로 한다.
- 12-1-3-3-2. 처리농도 수준간의 간격 : 반수치사농도(LC<sub>50</sub>)치를 구할 수 있는 적당한 처리농도 수준 단계를 설정하며 처리농도 수준간에는 일정한 공비를 둔다.
- 12-1-3-3-3. 기초시험은 5 mg/l (공기)의 약량을 4시간 동안 노출하되 약제 특성상 처리가 불가능한 경우는 가능한 최고농도로 노출하고, 시험결과 동물의 치사율이 50%미만인 경우는 그 이상의 처리농도 수준설정은 생략한다.
- 12-1-3-3-4. 약제의 특성 및 문헌정보에 따라 처리농도 수준 및 동물의 수를 증감하여 기초 시험 및 예비시험을 생략하고 본 시험을 실시할 수 있다.
- 12-1-3-4. 처리방법
- 12-1-3-4-1. 용매사용 : 시험약제의 적당한 농도를 유지시키기 위해 증류수를 사용하여 희석함을 원칙으로 하되 필요시는 적당한 용매 또는 현탁제를 사용할 수 있다.
- 12-1-3-4-2. 노출방법 : 흡입독성 실험장치를 사용 전신노출, 두부노출 또는 입과 코부위 노출로 하며 노출시간은 최소한 4시간 1회로 한다.
- 12-1-3-4-3. 흡입 chamber내 조건 및 급여 : 흡입 chamber내 산소량은 19%이상 유지해야 하며 온도는 22℃±2, 상대습도는 40~60%로 유지해야 하고 노출기간 동안에는 사료 및 물의 급여를 중단한다.
- 12-1-3-5. 대조군의 설정 : 노출 환경중에서의 적절한 농도를 유지시키기 위해 용매를 사용하였을 경우에 그 용매의 독성을 모를 때는 필요에 따라 용매 대

조건을 설정한다.

12-1-3-6. 관찰기간 : 약제처리 당일은 수시로 관찰하고 그 다음날 부터는 최소한 1일 1회로 14일이상 관찰하되 약제 특성에 따라 관찰 기간을 연장할 수 있다.

12-1-3-7. 물리적 측정

12-1-3-7-1. 공기의 유속, 온도, 습도는 계속적으로 측정되어야 하며 30분마다 기록하여야 한다.

12-1-3-7-2. 노출기간동안 피검물질의 농도는 항상 일정하여야 한다.

12-1-3-8. 임상관찰 : 육안적인 관찰로서 독성징후와 그 종류, 회복시기와 치사 시간 등을 관찰하여 가능한한 정확히 기록하여야 하며, 시험후 생존동물에 대해서는 체중 측정을 하여야 한다.

12-1-3-9. 체중측정 : 노출후 1주 간격으로 개체별 체중을 측정한다.

12-1-3-10. 부검소견 : 시험중 폐사동물 및 시험종료후 생존동물에 대한 부검소견을 기록하여야 한다.

12-1-3-11. 반수치사농도(LC<sub>50</sub>) 산출 : 시험 종료후 반수치사농도(LC<sub>50</sub>) 및 95% 신뢰 한계치를 산출하되, 기체 및 휘발성물질에 대해서는 ppm으로, 분말상태의 시료에 대해서는 mg/m<sup>3</sup> 또는 mg/l 로 표시한다.

#### **12-1-4. 피부자극성 시험**

12-1-4-1. 시험농약 : 제품농약. 다만, 원액이 강산 또는 강알칼리성 물질(pH 2 이하 또는 pH 11.5이상)인 제품농약은 시험을 수행하지 않는다. <개정 2017.12.28., 2020.2.28.>

12-1-4-2. 시험동물

12-1-4-2-1. 동물종 및 계통 : 백색 토끼를 사용하고 다른 종을 사용할 때는 타당한 사유를 제시하여야 한다. <개정 2017.12.28.>

12-1-4-2-2. 시험동물의 연령 및 수 : 건강하고 어린 동물(암컷 또는 수컷, 체중 2-3Kg가 적당)로서 초기시험에서 1마리를 사용하고 확인시험에서 2마리를 추가로 사용한다. <개정 2012.2.7., 2017.12.28.>

12-1-4-2-3. 시험동물실의 온도는 20±3℃, 상대 습도는 50~60%가 최적이나 30~70%도 가능하다. 12시간 주기로 인공 조명을 점멸한다. 일반적인 실험실용 사료를 사용하며 음용수는 제한하지 않는다. 동물은 각 케이지에서 개별적으로 사육한다. <신설 2017.12.28.>

### 12-1-4-3. 처리방법

12-1-4-3-1. 시험개시 약 24시간 전에 전기 삭발기 등을 이용하여 토끼 등부위의 털을 약 15cm × 15cm의 넓이로 깎는다. 이때 등부위의 피부가 손상되지 않도록 각별히 주의해야 하며 건강하고 깨끗한 피부를 지닌 동물만을 시험한다.

12-1-4-3-2. 고상 또는 paste상 농약은 중량으로 0.5g, 액상인 농약은 용량으로 0.5ml을 처리한다. <개정 2017.12.28.>

12-1-4-3-3. 고상인 농약은 물 또는 적당한 용매로 충분히 녹이거나 현탁시켜 피부에 골고루 도포한다. 다만, 용매 사용시 용매 대조구를 둘 수도 있다.

12-1-4-3-4. 시험물질을 6cm<sup>2</sup> (2×3cm)의 면적에 처리한 거즈(gaze)로 덮고 피부에 자극이 없는 테이프로 고정시킨다. 이 경우 토끼가 시험물질을 섭취하거나 흡입하지 못하도록 하여야 한다. 노출 후 물 또는 적절한 용매를 사용하여 시험물질을 제거한다. <개정 2012.2.7., 2017.12.28.>

12-1-4-3-5. 삭 제 <2012.2.7.>

12-1-4-3-6. 초기시험 <개정 2017.12.28.>

12-1-4-3-6-1. 시험 물질이 피부를 부식시킬 것으로 의심되는 경우, 동물 1 마리로 초기시험을 실시한다. 만약 시험물질이 피부를 부식시킨다는 명확한 증거가 있는 경우, 동물 시험을 더 이상 진행하지 않는다. <신설 2017.12.28.>

12-1-4-3-6-2. 3개의 시험 물질 첩포를 순차적으로 적용한다. 첫 번째 첩포는 적용 3분후 제거한다. 심각한 피부 반응이 관찰되지 않을 경우, 두 번째 첩포를 다른 부위에 적용하고 1시간 후 제거한다. 두 번째 노출 결과에서도 피부 반응이 관찰되지 않는 경우, 세 번째 첩포를 적용하고 4시간 뒤 제거하고 피부 반응 점수를 평가한다. <신설 2017.12.28.>

12-1-4-3-6-3. 3 번의 순차적 노출 후, 피부 부식이 나타날 경우에는 시험을 종료하고, 피부부식이 나타나지 않는 경우, 14일간 시험동물을 관찰한다. <신설 2017.12.28.>

12-1-4-3-6-4. 시험 물질이 피부부식성은 없지만 자극성이 있다고 판단되는 경우, 1개의 시험물질 첩포를 4시간 동안 시험동물에 적용하고 관찰한다. <신설 2017.12.28.>

12-1-4-3-7. 확인 시험 <신설 2017.12.28.>

12-1-4-3-7-1. 초기 시험에서 부식 영향이 나타나지 않은 경우 두 마리의 동물들을 추가로 사용하여 확인한다. <신설 2017.12.28.>

12-1-4-3-7-2. 자극성 또는 negative 반응을 관찰하기 위해 각각의 첩포를 4시간 동안 노출시킨다. <신설 2017.12.28.>

12-1-4-3-7-3. 초기 시험에서 피부자극성 나타난 경우, 확인 시험은 순차적인 방법으로 수행되거나 또는 두 마리 동물이 추가로 동시에 노출된다. <신설 2017.12.28.>

12-1-4-3-7-4. 초기 시험이 수행되지 않은 예외적인 경우, 두 마리 또는 세 마리 동물에게 단일 첩포를 4시간 노출시킨다. 두 마리 동물이 사용된 경우 두 마리 모두에게 같은 반응이 나타난다면 추가 시험이 필요하지 않다. 그렇지 않은 경우 세 번째 동물에 첩포를 4시간 노출시킨다. 반응이 불분명한 경우 추가 동물을 사용한 평가가 필요하다. <신설 2017.12.28.>

12-1-4-4. 임상관찰과 채점 : 시험물질 노출 후 14일 동안 시험동물을 관찰하고 14일 전에 가역 반응이 관찰되는 경우 시험을 종료한다. 흥반 및 부종 영향을 평가하기 위해, 첩포를 제거한 뒤 1, 24, 48, 및 72시간에 임상 증상과 피부에 나타나는 반응을 관찰하고 다음의 평가표에 따라 채점하여 기록한다. 초기 시험의 경우 첩포를 제거한 후 시험 부위의 반응도 즉시 평가한다. 피부 자극성 이외에 피부 탈지, 전신 독성영향과 같은 모든 국소 독성학적 영향이 나타날 경우 이를 충분히 기록한다. <개정 2017.12.28.>

12-1-4-4-1. 자극 반응을 평가하는 경우, 피부 손상의 가역성을 고려하여 탈모, 과각화증, 과형성, 박피 등이 14일간 지속될 경우 해당 시험물질은 자극성이 있는 것으로 판정한다. 피부반응을 판단하기 어려운 경우 조직병리학적 검사를 수행한다. <신설 2012.2.7., 개정 2017.12.28.>

<피부반응의 평가>

1) 흥반과 가피(괴사딱지)형성 .....	평점
○ 흥반이 전혀 없음 .....	0
○ 아주 가벼운 흥반(육안으로 겨우 식별할 정도) .....	1
○ 명확한 흥반 .....	2
○ 중간정도부터 심한 흥반 .....	3
○ 심한 흥반과 흥반을 평가할 수 없을 정도의 가피형성 .....	4
최고점=4	
2) 부종형성 평점	
○ 부종이 전혀 없음 .....	0
○ 아주 가벼운 부종(육안으로 겨우 식별할 정도) .....	1
○ 가벼운 부종(뚜렷하게 부어올라서 노출부위가 분명히 구별될 정도) .....	2
○ 보통의 부종(약 1mm 정도 부어오른 상태) .....	3
○ 심한 부종 (1mm이상 부어오르고 노출부위 밖에까지 확장된 상태) .....	4
최고점=4	

## 12-1-5. 안점막자극성시험

12-1-5-1. 시험농약 : 제품농약. 다만, 원액이 강산 또는 강알칼리성 물질(pH 2 이하 또는 pH 11.5이상)인 제품농약은 시험을 수행하지 않는다. <개정 2017.12.28., 2020.2.28.>

12-1-5-2. 시험동물

12-1-5-2-1. 동물종 및 계통 : 백색 토끼를 사용하고 다른 종을 사용할 때는 타당한 사유를 제시하여야 한다. <개정 2017.12.28.>

12-1-5-2-2. 시험동물의 연령 및 수 : 건강하고 어린 동물(암컷 또는 수컷, 체중 2-3Kg가 적당)로서 초기시험에서 1마리를 사용하고 이상이 없는 경우 확인시험에서 2마리를 추가로 사용한다. <개정 2012.2.7., 2017.12.28.>

12-1-5-2-3. 시험동물실의 온도는  $20\pm 3^{\circ}\text{C}$ , 상대 습도는 50~60%가 최적이나 30~70%도 가능하다. 12시간 주기로 인공 조명을 점멸한다. 일반적인 실험실용 사료를 사용하며 음용수는 제한하지 않는다. 동물은 각 케이지에서 개별적으로 사육한다. <신설 2017.12.28.>

12-1-5-2-4. 국소 마취제 및 전신 진통제 사용 <신설 2017.12.28., 개정 2018.11.30.>

12-1-5-2-4-1. 시험물질 처리 60분전에 buprenorphine 0.01 mg/kg을 피하 주사한다. <신설 2017.12.28.>

12-1-5-2-4-2. 시험물질 처리 5분전에 눈 마취제(0.5% proparacaine hydrochloride 또는 0.5% tetracaine hydrochloride 등)를 양쪽 눈에 1~2방울 처리한다. <신설 2017.12.28.>

12-1-5-2-4-3. 시험물질이 심한 통증이나 고통을 유발하는 경우 정상적으로 체내 시험을 실시하지 않는다. <신설 2017.12.28.>

12-1-5-2-4-4. 시험물질 처리 8시간 후 buprenorphine 0.01 mg/kg과 meloxicam 0.5 mg/kg을 피하 주사한다. <신설 2017.12.28.>

12-1-5-2-4-5. 시험물질 처리 8시간 이후에는 눈 자극이 소실되거나 통증 또는 고통이 소실될 때까지 매 24시간마다 buprenorphine 0.01 mg/kg과 meloxicam 0.5 mg/kg을 피하 주사한다. <신설 2017.12.28.>

12-1-5-2-4-6. 시험물질 처리 전에 조치한 마취가 불충분한 경우 시험물질 처리 즉시 추가 마취를 실시한다. 시험기간 동안 시험동물에 통증 또는 고통 증상이 나타나는 경우 즉시 buprenorphine 0.03 mg/kg을 피하 주사한다. 필요한 경우

추가마취로서 매 12시간마다 buprenorphine 0.01 mg/kg 피하 주사 대신, 매 8시간마다 buprenorphine 0.03 mg/kg을 피하 주사한다. <신설 2017.12.28.>

12-1-5-2-4-7. 국소 마취제 및 전신 진통제는 필요한 경우 사용하며 시험물질이 고통을 유발하거나 초기 시험에서 고통스런 반응이 나타난 경우 시험물질 처리 전에 사용한다. <신설 2018.11.30.>

12-1-5-3. 처리방법

12-1-5-3-1. 시험시작 24시간 전에 미리 안과학적 검사를 실시하여 안구손상이나 각막 손상 등이 없는 건강한 개체를 사용한다. <개정 2017.12.28.>

12-1-5-3-2. 고상과 반고상 농약의 용량은 0.1 ml 또는 중량으로 0.1 g을 초과하지 않는 범위 내에서 처리하며 액상의 농약은 희석하지 않고 0.1 ml를 처리한다. 다만, 고상의 농약은 마쇄하여 미세분말로 만든 다음 처리한다. 펌프 스프레이는 눈에 직접처리하지 않으며 액체 스프레이는 다른 용기에 수집 후 0.1 ml을 처리한다. 압력이 있는 에어로졸 용기에 있는 물질은 눈앞 10 cm 거리에서 약 1초 동안 처리한다. <개정 2017.12.28.>

12-1-5-3-3. 약제처리는 한쪽군의 하안검(下眼瞼)을 가볍게 잡아당기고 그 결막 낭내에 농약을 한번에 넣어 처리한다. 시험물질의 손실을 막기 위해 양안검(兩眼瞼)을 느슨하게 맞춰잡고 약 1초간 유지한다. 무처리한 다른 한쪽 눈은 대조로 한다.

12-1-5-3-4. 처리후 24시간까지는 눈을 세척할 필요가 없으나 24시간 이후에는 필요시 물이나 생리적 식염수로 눈을 세척할 수 있다. <개정 2017.12.28.>

12-1-5-3-5. 초기 시험 <신설 2017.12.28.>

12-1-5-3-5-1. 초기 시험은 한 마리의 동물을 사용하여 수행한다. <신설 2017.12.28.>

12-1-5-3-5-2. 초기 시험 결과, 심한 눈손상성 또는 심각한 자극성이 나타난 경우, 눈 자극성에 대한 추가 시험은 하지 않는다. <신설 2017.12.28.>

12-1-5-3-5-3. <삭제 2018.11.30.>

12-1-5-3-6. 확인 시험 <신설 2017.12.28.>

12-1-5-3-6-1. 초기 시험에서 심한 눈 손상성이 나타나지 않은 경우 두 마리의 동물을 추가로 사용한다. 초기 시험에서 심각한 자극성이 나타나고, 확인 시험에서 강한(비가역적) 영향이 나타난 경우, 두 마리의 추가 동물을 동시에 노출시키는 것 보다는 한 마리의 동물을 순차적으로 한 마리씩 사용할 필요가 있다. 두 번째 동물에서 심한 눈손상성 또는 심각한 자극성이 나타난 경우, 세 번째 동물에 대한 시험을 하지 않는다. 추가 동물들은 약한 자극 또는

보통 자극 반응을 확인하기 사용한다. <신설 2017.12.28.>

12-1-5-3-7. 눈세척 효과 확인 시험 <신설 2017.12.28.>

12-1-5-3-7-1. 눈세척 영향을 확인할 필요가 있는 경우 두 마리의 토끼를 사용한다. <신설 2017.12.28.>

12-1-5-3-7-2. 세척시간, 세척 용액의 온도와 구성, 지속기가, 부피, 적용 속도 등을 자세히 기록한다. <신설 2017.12.28.>

12-1-5-4. 임상적 관찰과 채점: 관찰은 처리 후 1시간, 24시간, 48시간 및 72시간 후에 각각 실시하여 평가표에 기록한다. 처리 72시간 후 까지도 자극성을 보이지 않을 경우에는 시험을 종료한다. 만약, 각막 장해 또는 그 이외의 안(眼)자극이 지속해서 나타날 경우에는 손상의 경과, 가역성 또는 비가역성을 판별하기 위하여 시험물질 투여 후 21일 간 관찰한다. 21일 이전에 가역성이 관찰되면 시험을 종료한다. 각막, 홍채 및 결막 이외의 부위에도 특이한 손상을 보일 때는 이를 충분히 기록한다. 24시간 관찰 종료후 플루오세레인(fluorescein) 용액을 사용하여 안검사(眼檢査)를 하여도 좋다. <개정 2012.2.7., 2017.12.28.>

12-1-5-5. 삭제 <2017.12.28.>

12-1-5-6. 시험물질을 처리한 동물에서 지속적인 심각한 고통이 나타나면 안락사 시키고 이에 따라 시험물질을 평가한다. 처리 후 다음과 같은 안구 병변이 나타나는 경우 안락사시킨다. : 각막 침공 또는 포도종(staphyloma)을 포함한 심각한 각막 궤양; 전방출혈; 48시간 동안 지속된 각막 혼탁 grade 4 ; 72시간 지속된 빛 반사작용 결핍 (홍채의 반응 grade 2); 결막 궤양; 결막 또는 순막 괴사; 찰과상. <신설 2017.12.28.> <개정 2020.2.28.>

### <안반응(眼反應)의 평가>

#### (1) 각 막

혼탁: 안구의 농후한 정도 (가장 농후한 지점을 관찰함) -----	평점
○ 화농이나 혼탁이 없음 -----	0
○ 혼탁이 분산 혹은 밀집되어 있으나 (정상적인 투명성이 약간 둔화된 것과는 다름) 홍채의 말단이 명확히 관찰됨 -----	1
○ 반투명한 부분이 쉽게 관측되면서 홍채의 말단이 약간 불명확함 -----	2
○ 진주 색깔을 띄면서 홍채의 말단이 관찰되지 않으나 동공의 크기가 가까스로 관측됨 -----	3
○ 각막이 불투명하고 혼탁 때문에 홍채가 관찰 안됨 -----	4

(2) 홍채

반응치 -----	평점
○ 정상 -----	0
○ 현저한 주름의 형성, 총혈, 종창 혹은 각막주위에 중등도의 총혈을 보이거나 홍채가 빛에 대해 반응함 -----	1
○ 홍채가 빛에 대한 반응이 없거나 출혈 또는 대부분이 파괴된 상태 -----	2

(3) 결막

발적 (안검결막, 안구결막에 한함. 각막, 홍채 제외) -----	평점
○ 혈관 정상 -----	0
○ 일부 혈관 총혈 -----	1
○ 얇은 심홍색(심홍색)을 띠거나 각각의 혈관이 쉽게 관찰 안됨 -----	2
○ 짙은 선홍색(선홍색) -----	3
결막 부종 -----	평점
○ 부풀지 않음 -----	0
○ 정상보다 약간 종창(순막 포함) -----	1
○ 안검의 부분적 외전을 동반한 현저한 종창 -----	2
○ 눈이 반쯤 잠길 정도의 안검의 종창 -----	3
○ 눈이 반 이상 감길 정도의 안검의 종창 -----	4

**12-1-6. 피부감작성시험**

12-1-6-1. 시험농약 : 제품농약, 다만, 강산 또는 강알카리성 물질(pH 2이하 또는 11.5이상)의 제품농약은 제외한다.

12-1-6-2. 시험동물

12-1-6-2-1. 동물종 및 성 : 성적으로 성숙한 기니픽을 사용한다. 다만, 암컷을 사용할 때에는 출산 경험이 없고 임신하지 않은 것이어야 한다.

12-1-6-2-2. 시험동물 수 : 시험방법에 따라 사용동물 수의 차이가 있을수 있으나 일반적으로 최소한 시험군 20마리, 대조군 10마리 이상을 원칙으로 한다.

12-1-6-3. 사육조건 : 실험동물실은 온도 20±3℃, 습도 30-70%, 명암교대 12시간으로 한다. 먹이는 기니아픽 전용 사료를, 음수는 상수 도수를 무제한 공급하며, 적당량의 아스코르빈산(0.01%)을 음수에 섞어 사양하여 비타민C의 결핍증을 예방하여야 한다.

12-1-6-4. 신뢰성 검증 : 양성대조 물질을 이용하여 시험법 및 사용동물의 신뢰성을 확인하기 위하여 매 6개월마다 검증한다.

12-1-6-5. 시험방법 : 피부감작성시험은 Freund's complete adjuvant(FCA)를 주사하여 미리 감작시키는 4가지의 공인된 FCA법과 FCA를 사용하지 않은 3가지의 공인된 non-adjuvant법 중 한가지 방법을 선택하여 시험하되 가능한 다음 "가" 및 "나"항의 방법에 따라 시험한다.

12-1-6-5-1. Guinea pig maximisation test method(GPMT)

12-1-6-5-1-1. 시험군으로 최소한 20마리와 대조군으로 10마리를 사용한다.

12-1-6-5-1-2. 감작성 유도를 위한 시험물질의 농도는 경미하거나 중등도의 피부자극성을 보이는 농도를 가장 높은 농도로 하되 그 밖의 독성증상을 보이지 않는 농도로 한다. 감작성야기를 위한 시험물질의 농도는 비자극성의 최고 농도로 해야 한다. 처리농도 결정을 위한 피부자극성 시험은 2-3마리로 실시 되어져야 하며, 이때에도 FCA를 전처리한 후 실시하여야 한다.

12-1-6-5-1-3. 감작유도 : 피내주사

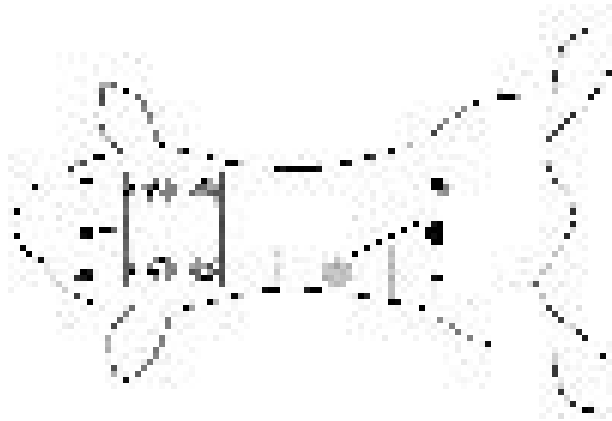
12-1-6-5-1-3-1. 0일 - 처리군

- 어깨부위의 털을 제거하고 다음 및 그림1과 같은 방법으로 동물 등 부위의 중앙선 양쪽의 3쌍에 0.1ml씩 피내주사를 실시한다.

부위 ① : FCA와 증류수 혹은 생리식염수를 1:1로 혼합한 물질

부위 ② : 적당한 용매에 용해된 결정된 농도의 시험물질

부위 ③ : 결정된 농도의 시험물질과 FCA와 증류수 혹은 생리 식염수를 혼합한 물질



<그림1> GPMT의 감작유도 및 감작야기 부위

- 부위 ③에서 물에 녹는 물질은 FCA와 혼합하여 수용액에 용해시키고, 유기용매에 녹거나 용해되지 않는 물질은 FCA에 현탁하여 혼합한다. 시험물질의 농도는 부위 ②에 사용된 것과 동일하다.
- 부위 ①과 ②는 서로 가깝게 위치하게 하고 머리쪽에 가까운 반

면, 부위③은 꼬리 쪽으로 위치하게 한다.

12-1-6-5-1-3-2. 0일 - 대조군

○ 처리군과 동일하게 3쌍의 피내주사를 실시한다.

12-1-6-5-1-4. 감작유도 : 국소처리

12-1-6-5-1-4-1. 5-7일 - 처리군 및 대조군

○ 시험물질이 자극성이 없으면 시험물질 도포 24시간 전에 국부적인 자극성(경도의 염증)을 유발하기 위하여 10% SDS(sodium dodesyl sulfat) 백색 바셀린을 털을 제거한 부위에 바른다.

12-1-6-5-1-4-2. 6-8일 - 처리군

○ 약제 처리부위의 털을 제거하고 여과지(2×3cm)에 시험물질을 흡착시켜 처리부위에 단단하게 밀착시켜 첩포한후 48시간 동안 유지시킨다. 고상일 경우에는 미세한 분말상태로 하여서 적절한 용매에 혼합하여 처리한다.

12-1-6-5-1-4-3. 6-8일 - 대조군

○ 처리군과 동일하나 처리물질이 용매이다.

12-1-6-5-1-5. 감작야기 : 국소처리

12-1-6-5-1-5-1. 20-22일 - 처리군과 대조군

○ 처리군과 대조군 동물의 옆구리 부위의 털을 제거한다. 시험물질을 폐쇄첩포(patch)법으로 제모된 옆구리 부위에 24시간 부착한다.

12-1-6-5-1-6. 관찰 : 처리군 및 대조군

12-1-6-5-1-6-1. 필요하면 시험물질 제거후 21시간에 털을 제거한다.

12-1-6-5-1-6-2. 제모 3시간 후(감작야기 시작으로 부터 48시간)에 피부반응을 조사한다.

12-1-6-5-1-6-3. 24시간 후(감작야기 시작으로 부터 72시간)에 두번째의 피부반응을 조사한다.

12-1-6-5-1-7. 피부반응 성적

- 0 ----- 육안적으로 변화 없음
- 1 ----- 산재성의 부분적인 홍반
- 2 ----- 중등도의 전반적인 홍반
- 3 ----- 강도의 홍반 및 부종

12-1-6-5-1-8. 2차 감작야기 : 1차 감작야기의 결과를 확인하기 위하여 1차 처리 일주일 후 2차 감작야기 시험을 실시할 수 있다. 이때 대조구는 새로운

실험동물을 사용하고 2차 감각야기는 첫번째 대조구의 동물을 사용할 수도 있다.

#### 12-1-6-5-1-9. 일반증상

12-1-6-5-1-9-1. 모든 피부반응, 감각유도 및 감각야기 단계를 거치는 동안 발생한 비정상적인 반응을 관찰 한다.

12-1-6-5-1-9-2. 필요에 따라 병리조직학적 검사 및 피부의 두께등을 측정할 수도 있다.

#### 12-1-6-5-2. Buehler test method

12-1-6-5-2-1. 동물수 : GPMT와 동일

12-1-6-5-2-2. 처리용량

12-1-6-5-2-2-1. 감각유도를 위한 시험물질의 농도는 경미한 자극을 일으킬 수 있는 농도중 가장 높은 농도를 선택하고, 감각야기 농도는 자극성을 일으키지 않는 농도 중 최고농도로 한다. 농도 결정 방법은 GPMT와 동일하다.

12-1-6-5-2-2-2. 물에 용해되는 시험물질은 증류수 혹은 자극성이 없는 유기용매에 녹여서 처리하고, 다른 물질의 경우 감각유도는 80% 에탄올에, 감각야기는 아세톤에 녹여서 시험한다.

12-1-6-5-2-3. 감각유도 : 국소처리

12-1-6-5-2-3-1. 0일 - 처리군

- 한쪽 옆구리의 털을 깨끗이 제거한다. 시험물질을 적절히 처리하여 6시간 동안 폐쇄접포 한다.

- 접포는 철저히 폐쇄되어야 하고, 사용 패드는 면이 좋으며 원형이나 사각형의 4-6cm<sup>2</sup>크기의 것을 사용한다.

12-1-6-5-2-3-2. 0일 - 대조군

- 처리군과 동일하나 시험물질 대신 용매를 사용한다.

12-1-6-5-2-3-3. 6-8일 과 13-15일 - 처리군 및 대조군

- 0일과 동일하게 처리군과 대조군에 대하여 반복 수행한다.

12-1-6-5-2-4. 감각야기

12-1-6-5-2-4-1. 27-29일 - 처리군 및 대조군

- 처리군과 대조군 실험동물의 사용하지 않은 옆구리의 털을 제거하고, 감각야기 농도의 시험물질을 감각유도 단계 처리방법과 동일하게 6시간동안 부착한다.

12-1-6-5-2-5. 관찰 - 처리군 및 대조군

12-1-6-5-2-5-1. 6시간 후에 첩포를 제거하고 도포 부위를 씻어준다.

12-1-6-5-2-5-2. 첩포제거 후 21시간에 제모한다.

12-1-6-5-2-5-3. 제모 3시간 후(감작야기 첩포 후 30시간)에 GPMT와 동일하게 피부반응을 조사 한다.

12-1-6-5-2-5-4. 24시간후(야기 54시간)에 다시 피부반응을 조사한다.

12-1-6-5-2-6. 2차 감작야기 : GPMT와 동일한 방법으로 2차야기를 실시한다.

12-1-6-5-2-7. 일반증상: GPMT와 동일하다.

### 12-1-7. 급성지발성신경독성시험

12-1-7-1. 시험농약

유기인제 농약의 원제

12-1-7-2. 시험동물

8~14개월령의 체중 2.0kg 내외인 성숙산란계를 사용한다.

12-1-7-3. 양성 및 음성대조군 설정

12-1-7-3-1. 지발성신경독성물질(뒤늦게 증상이 나타나는 성질의 신경독성물질)[양성대조물질 : TOCP (tri-ortho-cresylphosphate)]를 처리한 양성대조군과 시험물질을 처리한 시험군 및 시험물질을 처리하지 않은 시험군과 동일한 시험조건의 음성대조군을 두어야 한다.

12-1-7-4. 시험군 설정 및 사용동물수

시 험 군	투여물질	투여약량	동물수*
음성대조군	Cornoil	10 ml/kg 정도	6
양성대조군	TOCP	750 mg/kg 정도	2
시험군 I	시험물질	LD <sub>50</sub>	6
시험군 II	시험물질	>LD <sub>50</sub>	6

\* 시험기간인 21일후에 생존한 최소동물수

12-1-7-5. 시험약량 설정

12-1-7-5-1. 예비시험 : 급성경구독성시험방법으로 5마리 닭을 3군으로 설정하여 보호제 없이 시험물질을 1회 경구투여하여 LD<sub>50</sub>을 구한다.

12-1-7-5-2. 약량설정시험

12-1-7-5-2-1. LD<sub>50</sub>에 해당하는 용량을 시험군 I 의 투여약량으로 한다.

12-1-7-5-2-2. LD<sub>50</sub> 이상 3용량을 설정, 각 군에 대하여 보호제(황산아트로핀)를 전처리한 후 시험 물질을 경구 투여 한 다음 1주일간 관찰하고 실험동물

이 모두 생존한 군을 시험군 II의 투여 약량으로 한다.

12-1-7-5-2-3. 투여약량이 5,000 mg/kg 이상인 약제는 시험할 필요가 없다.

12-1-7-6. 투여방법

12-1-7-6-1. 모든 시험군에 대하여 시험물질 투여 30분전에 황산아트로핀 30 mg/kg 정도를 증류수에 녹여 zonde나 gelatincapsule에 넣어 경구투여 한다.

12-1-7-6-2. 시험농약은 1회에 한하여 강제경구 투여하되, 신경독성 증상이 관찰되지 않거나 불명확하면 동일용량을 재투여한 후 21일간 관찰한다.

12-1-7-7. 관찰기간 : 약제투여 후 당일에는 투약후 1, 2 및 4시간후에, 이후는 21일간 매일 관찰한다.

12-1-7-8. 관찰항목

12-1-7-8-1. 생화학적 검사

12-1-7-8-1-1. AChE 측정 : 투여후 72시간에 혈장, 뇌 및 척수 내의 AChE활성을 측정한다.

12-1-7-8-1-2. NTE 측정 : 투여후 72시간에 뇌와 척수 내의 NTE활성을 측정한다.

12-1-7-8-2. 임상적 관찰

12-1-7-8-2-1. 신경독성증상 발현유무는 투여 1일에는 1, 2 및 4시간 후에 관찰하며 이후 21일간 매일 1회이상 관찰한다.

12-1-7-8-2-2. 독성증상 확인시 발현시기, 증상의 정도 및 지속시간을 관찰한다.

12-1-7-8-2-3. 경미한 증상도 소견을 적고, 1주일에 2회 정도 일정 시간 강제운동을 시키고 관찰소견을 기록한다.

12-1-7-8-3. 체중측정 : 투여개시전과 투여후 1주 간격으로 개체별 체중을 측정한다.

12-1-7-8-4. 부검소견 : 시험기간중 폐사한 동물은 부검하여 외표면, 구강 등 체강을 육안으로 관찰하여 이상유무를 확인한다.

12-1-7-8-5. 병리조직학적 검사

12-1-7-8-5-1. 21일간 시험이 종료되면 생존한 전 시험군을 전신마취 시킨 후 10% 중성 포르말린으로 전신 관류고정 시킨다.

12-1-7-8-5-2. 뇌, 척수 및 좌골신경을 적출하여 10% 중성 포르말린에 고정시킨 후 수초와 축색 특이염색을 실시하여 현미경으로 병변을 관찰한다.

12-1-7-9. 종합평가: 보행자세를 포함한 임상증상과 AChE, NTE억제 그리고 병

리조직학적 소견 등을 종합하여 지발성 신경독성 유무를 평가한다.

### 12-1-8. 유전독성시험 <개정 2010.2.9.>

12-1-8-1. 시험의 기본원칙 : 다음의 3가지 시험을 실시하는 것을 원칙으로 한다.

12-1-8-1-1. 유전자 돌연변이를 검출할 목적으로 하는 시험(유전자 이상시험).

12-1-8-1-2. 염색체 이상을 검출할 목적으로 하는 시험(염색체 이상시험).

12-1-8-1-3. 소핵시험, DNA손상/수복 시험 및 이와 동등이상의 결과를 얻을 목적으로 하는 시험 예를들면 "가"항에 해당하는 시험으로는 세균을 이용한 복귀돌연변이 시험 "나"항에 해당하는 시험으로는 포유류 배양세포를 이용한 염색체 이상시험, "다"항에 해당하는 시험으로는 설치류를 이용한 소핵시험 등이 있으며 이들에 대한 시험방법은 다음과 같다.

12-1-8-2. 시험농약 : 원제를 이용하는 것을 원칙으로 한다.

12-1-8-3. 세균을 이용한 복귀돌연변이 시험

12-1-8-3-1. 시험방법의 원리 : 세균을 이용한 복귀돌연변이 시험은 살모넬라균 또는 대장균을 이용하여 대사 활성화계를 사용하는 방법과 대사 활성화계를 사용하지 않는 방법을 병행하여 실시한다. 세균에 농약을 처리하여 최소한천 배지에 도말한 후 일정시간 배양하여 복귀돌연변이 colony수를 계수하고 용매대조의 plate에 나타난 자연돌연변이체수와 비교한다. 여기에서 대사활성화법으로는 마이크로솜의 약물대사 효소계를 유도하기 위해 전처리한 간균질물의 상층액(S-9)에 보조인자를 첨가한(s-9 Mix)것을 이용한다.

12-1-8-3-2. 시험용 균주 : 원칙적으로 살모넬라(*Salmonella typhimurium*) TA100, TA98, TA1535, TA1537을 이용하며, 그 이외에 이들 균주와 병행하여 TA102, TA97 또는 대장균 WP2uvrA를 사용할 수도 있다.

12-1-8-3-3. 농약의 처리농도 설정 : 농약의 처리농도는 적어도 5단계 이상으로 하고, 그중 최고 농도는 항균성 효과를 보이는 농도로 한다. 다만, 항균성 효과를 보이지 않을 경우에는 농약의 용해한도로 처리하되 5mg/plate를 초과하지 않는다.

12-1-8-3-4. 대조군 설정 : 용매대조군과 S-9 mix를 필요로 하지 않는 양성대조군 및 S-9mix를 필요로 하는 양성대조군을 설정한다.

12-1-8-3-5. 사용 plate수 : 대조 및 농약의 각 처리 농도당 2매 이상의 plate를 사용한다.

12-1-8-3-6. 복귀돌연변이 검색 : Plate는 37℃에서 48~72시간 항온배양한 후 plate에 나타난 colony수를 계수하고 복귀돌연변이 유발빈도를 구한다.

12-1-8-4. 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상 시험

12-1-8-4-1. 시험방법의 원리 : 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상 시험은 대사 활성화계를 이용하지 않는 방법과 대사 활성화계를 이용하는 방법을 병행하여 실시하여야 한다. 농약을 포유류 배양세포에 처리한 후 콜히친 또는 콜세미드(colcemid)를 여러 단계로 전처리하여 염색체 표본을 경시적으로 만들어 분열 중기상(中期像)에서 염색체 이상을 검경한다.

12-1-8-4-2. 시험용 세포 : 포유류의 초대, 계대 배양세포 또는 주세포를 이용한다. 예를 들면 chinese hamster 계통의 세포주(CHL, CHO)등이 있다.

12-1-8-4-3. 농약의 처리농도 설정 : 농약의 처리농도는 적어도 3단계 이상으로 하고, 그중 최고농도는 50%의 세포증식 억제가 일어나는 농도로 한다. 다만 세포독성이 나타나지 않는 경우에는 농약의 용해 한도로 처리하되 10mM을 초과하지 않는다.

12-1-8-4-4. 대조군 설정 : 포유류 배양세포에서 염색체 이상을 일으키는 것으로 알려져 있는 화학물질을 양성대조로 사용하며 음성대조로는 용매와 무처리 대조로 나누어 시험한다.

12-1-8-4-5. 대사활성화 : 대사활성화법에 의한 시험을 수행하여야 하며, 이 경우 대사활성화를 필요로 하는 것으로 알려진 화학물질을 양성대조로 설정하여 시험한다.

12-1-8-4-6. 배양 plate수 : 각 농도당 적어도 2매 이상의 plate를 사용한다.

12-1-8-4-7. 염색체이상의 검색 : 각 농도당 100개의 중기 세포분열상을 관찰하여 염색체 구조이상이 있는 세포 및 배수체(diploid)의 출현빈도를 검색 한다.

12-1-8-5. 설치류를 이용한 소핵시험

12-1-8-5-1. 시험방법의 원리 : 농약을 설치류에 경구 또는 복강으로 투여한 후 18~72시간 사이에 동물을 도살하고 대퇴골로 부터 골수를 채취하여 도말표본을 제작, 염색하여 검경한다.

12-1-8-5-2. 실험동물 : 실험동물로는 마우스나 그 밖의 설치류를 사용한다. 사용동물수는 각 투여 용량당 성숙한 동물 암·수 각각 6마리를 사용한다.

12-1-8-5-3. 농약 투여방법 : 경구 또는 복강으로 1회 투여함을 원칙으로 하되 필요시 24시간 간격으로 2~5회 연속 투여한다. 투여용량 수준은 적어도 3단계 이상으로 설정하고, 그 중 최고용량에서도 치사 또는 골수의 세포증식이

현저히 억제되지 않아야 한다.

12-1-8-5-4. 대조군 설정 : 음성대조군은 무처리 또는 용매대조군으로 하고, 양성 대조군에는 이미 알려진 소핵 유발 물질을 사용한다.

12-1-8-5-5. 소핵유발빈도 검색 : 1,000개의 다염성 적혈구 중 소핵을 가진 적혈구를 계수하고 음성대조 및 양성대조와 비교하여 소핵유발빈도를 검색한다.

## **12-1-9. 기형독성시험**

12-1-9-1. 시험농약 : 원제

12-1-9-2. 시험동물

12-1-9-2-1. 동물종 및 계통 : 2종 이상의 포유동물을 사용하되 랫드와 토끼를 이용함이 바람직하다. 계통은 일반적으로 사용되는 동물로 하되, 다산성으로 기형독성 물질에 대한 반응 특성이 명확한 계통을 선택한다.

12-1-9-2-2. 시험군 : 임신된 동물의 수는 랫드, 마우스 및 햄스터가 각 실험군당 20마리 이상을 그리고 토끼가 각 실험군당 12마리 이상을 사용한다.

12-1-9-3. 시험군의 설정 : 적어도 3군의 투여군과 대조군을 설정한다.

12-1-9-3-1. 최고용량은 시험농약의 물리화학적 또는 생물학적 특성에 의해 제한을 받지 않는한 체중감소 등 시험농약에 의해 초래되는 명확한 독성징후가 모체에 나타나는 양으로 하되 시험동물의 10% 이상이 폐사하지 않는 양으로 한다.

12-1-9-3-2. 최저용량은 시험농약에 기인하는 독성징후가 조금도 나타나지 않는 양으로 한다.

12-1-9-3-3. 중간용량은 최고 및 최저 용량 사이에서 등비급수적으로 선택한 용량으로 한다.

12-1-9-3-4. 시험농약의 독성이 낮아 1,000 mg/kg에서도 태자독성이나 기형독성이 인정되지 않을 경우 그 이상 농도에서의 시험은 수행하지 않는다.

12-1-9-4. 대조군

12-1-9-4-1. 시험농약을 투여할 때 용매를 사용할 경우 용매대조군을 둔다.

12-1-9-4-2. 용매는 기형독성을 가지거나 생식기능에 영향을 미치는 것은 사용할 수 없다.

12-1-9-4-3. 그 밖에 양성대조를 둘 수 있다.

12-1-9-5. 투여방법 : 경구투여를 원칙으로 하며, 투여기간 중 투여시간은 일정해야 한다.

#### 12-1-9-6. 투여기간

12-1-9-6-1. 질내에 정자가 관찰된 날을 임신 0일로 하되, 교미를 확인한 경우나 인공수정을 한 경우에는 당해일의 익일을 임신 0일로 한다.

12-1-9-6-2. 투여기간은 태자의 기관형성기를 포함하는 기간으로 한다(랫드와 마우스는 임신 6-15일, 햄스터는 임신 6-14일, 토끼는 임신 6-18일).

12-1-9-7. 관찰항목 : 임신 기간동안 1일 1회 주의깊게 임상증상을 관찰한다. 동물에 임상증상이 관찰되는 경우 그 발현 시기, 정도 및 지속기간을 기록한다.

#### 12-1-9-7-1. 모체

12-1-9-7-1-1. 일반증상

12-1-9-7-1-2. 체중

12-1-9-7-1-3. 사료섭취량, 음수량

12-1-9-7-1-4. 황체수

12-1-9-7-1-5. 병리학적 검사

#### 12-1-9-7-2. 태자

12-1-9-7-2-1. 체중

12-1-9-7-2-2. 성별, 생사수, 흡수배아수 및 착상수

12-1-9-7-2-3. 외형이상 유무

12-1-9-7-2-4. 골격이상 유무(랫드, 마우스 및 햄스터의 경우 전체 태자의 1/3-1/2을 실시)

12-1-9-7-2-5. 내장이상 유무(랫드, 마우스 및 햄스터의 경우 태자의 나머지를 실시)

12-1-9-7-2-6. 토끼의 경우, 각 태자를 해부하여 먼저 내장기형을 조사한 후 골격 이상을 검사한다.

### **12-1-10. 반복투여경구독성시험 <개정 2010.2.9.>**

12-1-10-1. 시험농약 : 원제

12-1-10-2. 시험동물

12-1-10-2-1. 설치류와 비설치류를 사용할 수 있고, 설치류 사용을 원칙으로 한다. 연속된 시험일 경우, 급성독성시험에서 사용한 동일종을 사용하는 것이 좋다. <2018.9.14.>

12-1-10-2-2. 연령 : 5내지 6주령으로서 성별로 평균체중의  $\pm 20\%$  범위내에서 균일한 개체를 사용한다.

- 12-1-10-2-3. 성별 및 시험동물수 : 각 시험약량 수준당 암수 각각 10마리 이상을 시험한다.
- 12-1-10-2-4. 시험군의 설정 : 최소 3개 수준 이상의 시험군과 대조군을 두어야 한다.
- 12-1-10-2-4-1. 최고용량은 시험물질에 의한 독성영향은 있으면서 치사는 되지 않는 용량으로 한다.
- 12-1-10-2-4-2. 최저용량은 독성을 일으키지 않는 용량으로 한다.
- 12-1-10-2-4-3. 중간용량은 최고 및 최저용량 사이에서 등비급수적으로 선택한 용량으로 한다.
- 12-1-10-2-4-4. 시험농약의 독성이 낮아서 1,000mg/kg의 농도에서도 독성징후가 관찰되지 않을 경우에는 3개농도를 사용한 실험을 하지 않아도 된다.
- 12-1-10-2-4-5. 대조군은 시험물질 투여를 제외한 모든 처치가 시험군과 같아야 한다.
- 12-1-10-3. 투여방법 : 시료의 성상에 따라 강제 경구투여 또는 사료 및 음수에 첨가하여 투여한다.
- 12-1-10-4. 투여기간 : 90일간 1일 1회, 주 5회 이상을 투여함을 원칙으로 하고, 강제 경구투여의 경우에는 하루 중 동일한 시기에 투여하여야 한다.
- 12-1-10-5. 관찰 및 측정항목
- 12-1-10-5-1. 임상증상은 매일 1회 이상 주의깊게 관찰한다.
- 12-1-10-5-2. 체중, 사료 및 물 섭취량 등은 매주 1회 이상 측정한다.
- 12-1-10-5-3. 혈액학적 검사 : 적혈구수, 백혈구수, 백혈구 분획, 헤모글로빈양, 헤마 토크릿치, 혈소판수, 망상적혈구수, 적혈구크기, 평균적혈구용적, 평균혈구색소량 및 평균혈구색소 등을 측정한다.
- 12-1-10-5-4. 혈액생화학 : 단백, 요소질소, 혈당, 콜레스테롤, 트랜스아미나제, 알칼리성 포스파타제, 나트륨, 칼륨, 염소, 인, 빌리루빈, 크레아티닌, GOT 및 GPT 등을 측정한다.
- 12-1-10-5-5. 안구검사 : 시험 개시전과 종료시에 관찰한다.
- 12-1-10-5-4. 병리조직학적 검사
- 12-1-10-5-4-1. 육안적 검사 및 주요 장기의 중량 측정
- 12-1-10-5-4-2. 주요 장기의 현미경적 검사
- 12-1-10-5-5. 소변검사 : 중간도살 및 종료시 검사
- 12-1-10-5-6. 최대내성용량 및 최대무작용량

## 12-1-11. 반복투여경피독성시험 <개정 2010.2.9.>

12-1-11-1. 시험농약 : 원제

12-1-11-2. 시험동물

12-1-11-2-1. 동물종 및 계통 : 랫드(SPF 동물)을 사용함을 원칙으로 하며, 토끼와 기니픽을 사용할 수도 있다. 연속된 시험일 경우, 급성독성시험에서 사용한 동일종을 사용하는 것이 좋다.

12-1-11-2-2. 연령 : 건강하고 성숙한 동물로서 체중이 랫드는 200-300g, 토끼는 2-3kg 그리고 기니픽은 350-450g의 것을 사용하는 것이 좋으며, 성별로 평균체중의  $\pm 20\%$  범위 내에서 균일한 개체를 사용한다.

12-1-11-2-3. 성별 및 시험동물수 : 각 시험약량 수준당 암수 각각 10마리 이상을 사용한다.

12-1-11-2-4. 시험군의 설정 : 대조군을 포함한 최소 3개 수준 이상의 시험군과 용매 대조군을 두어야 한다.

12-1-11-2-4-1. 최고용량은 시험물질에 의한 독성영향은 있으면서 치사는 되지 않는 용량으로 한다.

12-1-11-2-4-2. 최저용량은 독성을 일으키지 않는 용량으로 한다.

12-1-11-2-4-3. 중간용량은 최고 및 최저용량 사이에서 등비급수적으로 선택한 용량으로 한다.

12-1-11-2-4-4. 시험농약의 독성이 낮아서 1,000mg/kg의 농도에서도 독성징후가 관찰되지 않을 경우에는 3개농도를 사용한 실험을 하지 않아도 된다.

12-1-11-2-4-5. 대조군은 시험물질 투여를 제외한 모든 처치가 시험군과 같아야 한다.

12-1-11-2-4-6. 용매대조군은 시험물질을 제외한 모든 처치가 시험군과 같아야 한다.

12-1-11-3. 처리방법 : 급성경피독성시험법에 준함.

12-1-11-4. 처리기간 : 90일간 1일 1회 6시간정도로 주 5회 이상을 투여함을 원칙으로 한다.

12-1-11-5. 관찰 및 측정항목 : 90일간 1일 1회 6시간 정도로 주 5회 이상을 투여함을 원칙으로 한다.

12-1-11-5-1. 임상증상은 매일 1회 이상 주의깊게 관찰한다.

12-1-11-5-2. 체중, 사료 및 물 섭취량 등은 매주 1회 이상 측정한다.

- 12-1-11-5-3. 혈액학적 검사 : 아급성경구독성시험법에 준함.
- 12-1-11-5-4. 혈액생화학 : 아급성경구독성시험법에 준함.
- 12-1-11-5-5. 안구검사 : 아급성경구독성시험법에 준함.
- 12-1-11-5-6. 병리조직학적 검사 : 아급성경구독성시험법에 준함.

## **12-1-12. 만성반복투여경구독성시험 <개정 2010.2.9.>**

- 12-1-12-1. 본 시험은 시험물질을 장기간 반복투여 했을 때 일어나는 독성변화, 즉 중독을 명확하게 일으키는 용량 및 독성변화를 일으키지 않는 최고투여 용량(무독성량)에 대해서 과학적 지식을 얻는 것을 목적으로 한다.
- 12-1-12-2. 시험물질 : 원제
- 12-1-12-3. 실험동물
  - 12-1-12-3-1. 설치류와 비설치류를 사용할 수 있고, 설치류 사용을 원칙으로 한다. <2018.9.14. >
  - 12-1-12-3-2. 설치류에 대해서는 이유 후 순화기간을 걸쳐 가능한 한 빠른 시기의 동일 주령 동물(통상5~6주령)을 이용, 비설치류에 대해서는 4~6개월령의 동물을 이용한다.
  - 12-1-12-3-3. 사용동물 수는 암수 동수를 원칙으로 하며, 또한 암컷은 출산경험이 없고, 임신하지 않은 것을 이용한다.
- 12-1-12-4. 투여방법 : 경구에 의한 연속투여로 하고 통상, 사료혼입 혹은 음수에 혼합하여 투여한다. 단, 사료혼입 혹은 음수혼합투여가 곤란한 경우에는 강제 경구투여 할 수 있다.
- 12-1-12-5. 투여기간 : 1년 이상으로 한다.
- 12-1-12-6. 동물수 및 시험군의 설정
  - 12-1-12-6-1. 동물수의 설정
    - 12-1-12-6-1-1. 설치류는 1군당 암수 각 20마리 이상, 비설치류는 1군당 암수 각 4마리 이상으로 한다.
    - 12-1-12-6-1-2. 각 동물군의 분리는 체중층별 등에 의한 무작위 추출법으로 한다.
    - 12-1-12-6-1-3. 시험결과를 평가하기에 충분한 동물 수를 확보하여야 한다.
  - 12-1-12-6-2. 시험군의 설정
    - 12-1-12-6-2-1. 시험물질투여군
      - 12-1-12-6-2-1-1. 대조군외에 적어도 3단계의 용량군을 설정한다.

12-1-12-6-2-1-2. 용량단계는 시험물질의 독성증상을 명확히 밝히고 무독성량 (NOAEL) 추정이 가능하도록 정한다. 최고용량은 다수의 사망을 일으키지 않으나 독성영향이 인정되어지는 용량, 최저용량은 아무런 독성증상이 인정되지 않는 용량으로 하고 용량반응관계가 보여지도록 각 용량단계를 설정한다.

12-1-12-6-2-1-3. 용량설정은 90일간 반복경구투여독성시험의 결과 등을 참고하여 용량설정의 근거를 제시하여야 한다.

12-1-12-6-2-1-4. 기술적으로 투여가능한 최대량 또는 1,000mg/kg/day 상당량에서 아무런 독성영향이 인정되지 않는 경우에는 그 이상의 투여량으로 시험할 필요는 없다.

12-1-12-6-2-2. 대조군

12-1-12-6-2-2-1. 시험물질을 투여하지 않는 것을 제외한 모든 점은 시험물질 투여군과 동일조건으로 한다.

12-1-12-6-2-2-2. 시험물질의 투여에 용매 등을 사용하는 경우에는 투여용매량의 가장 많은 용량군과 동량의 용매를 투여한다.

12-1-12-6-2-2-3. 독성에 관한 정보가 충분히 밝혀지지 않은 용매 등을 사용하는 경우에는 용매투여 대조군을 추가한다.

12-1-12-7. 관찰 및 검사

12-1-12-7-1. 일반상태의 관찰

12-1-12-7-1-1. 모든 동물에 대해서 일반상태를 매일 관찰한다.

12-1-12-7-1-2. 정기적으로 체중 및 먹이섭취량을 측정한다(음수혼합투여의 경우에는 섭취량도 측정한다)

12-1-12-7-1-3. 체중 및 먹이섭취량의 측정은 통상 투여개시전에 1회, 투여개시 후는 3개월까지는 적어도 주 1회, 그 이후는 적어도 4주에 1회의 비율로 실시한다.

12-1-12-7-1-4. 시험물질의 섭취량을 산출한다.

12-1-12-7-2. 혈액검사

12-1-12-7-2-1. 설치류에 대해서는 투여개시 후 6개월 및 시험종료 시, 비설치류에 대해서는 투여개시전, 투여개시후 6개월 및 시험종료시에 검사한다. 검사는 모든 동물에 대해서 하는 것을 원칙으로 하지만 설치류에 대해서는 각 군의 일부동물(암수 각10마리 이상)로 한정하여도 좋다.

12-1-12-7-2-2. 마우스를 제외하고는 검사 전에 하룻밤 절식시키는 것이 바람

직하다.

12-1-12-7-2-3. 검사는 아래 항목에 대해서 수행하지만 그 외에 시험마다 적절한 항목을 추가 선정하여 행한다. 또한 검사항목 및 검사방법은 국제적으로 널리 채택하고 있는 것을 선정한다.

12-1-12-7-2-3-1. 혈액학적 검사 : 적혈구수, 백혈구수, 혈액상(백혈구형별 백분율), 혈소판수, 혈색소량, 헤마토크리트치, 기타 필요에 따라서 망상적혈구수, 응고능(프로톰빈 시간, 활성화부분 트론보프라스틴 시간) 등

12-1-12-7-2-3-2. 혈액생화학적 검사 : 혈청(혈장), 총단백, 알부민, A/G비, 포도당, 콜레스테롤, 트리글리세이드, 비리루빈, 요소질소, 크레아티닌, 트랜스아미나제[AST(GOT), ALT(GPT)].  $\gamma$ -GPT, 알칼리포스파타제, 전해질(나트륨, 칼륨, 염소, 칼슘, 무기인 등) 등

12-1-12-7-3. 소변검사

12-1-12-7-3-1. 설치류는 각 군마다 일정의 동물(암수 각 10마리 이상)을 선정, 비설치류는 각 군 모든 동물에 대해서 같은 시기에 혈액검사와 뇨검사를 실시한다.

12-1-12-7-3-2. 혈액검사 대상 동물에 대해서 실시하는 것이 바람직하다.

12-1-12-7-3-3. 소변검사는 다음의 항목에 대해서 실시한다. 소변량, pH, 케톤체, 비리루빈, 유로비리노-겐, 잠혈(대변에 섞인 소량의 혈액), 침사, 비중 등

12-1-12-7-4. 안과학적 검사 : 비설치류는 모든 동물, 설치류는 적어도 고용량군과 대조군에 대해서 투여개시전과 시험 종료 후에 행한다. 시험물질투여에 의해 변화가 생긴 경우에는 모든 동물을 검사한다.

12-1-12-7-5. 병리학적 검사

12-1-12-7-5-1. 투여기간 중에 사망한 동물은 발견 즉시 부검하여 기관, 조직의 육안적 관찰 및 병리조직학적 검사를 한다. 사인(死因) 및 그 시점에서 독성변화의 정도를 확실하게 구명하도록 노력한다.

12-1-12-7-5-2. 투여기간 중에 사망에 임박한 동물은 발견즉시 도살하여 부검하고 1)과 같은 사항의 관찰 및 검사를 한다. 빈사상태에 이른 원인과 그 시점에서의 독성변화과정을 확실하게 구명하도록 노력한다.

12-1-12-7-5-3. 투여종료 시점에서 모든 생존동물은 제반 검사 등을 위한 채혈 및 채뇨를 한 후에 도살, 부검하여 기관, 조직의 육안적 관찰을 한다. 또한, 설치류에서는 각 군의 암수 각 10마리 이상, 비설치류에서는 각 군의 모든 동물에 대해서 통상 아래에 기재하는 기관의 중량을 측정한다. 검사를 위해

마우스를 제외하고 부검 전에 1일밤 절식시키는 것이 바람직하다.

12-1-12-7-5-3-1. 간장, 신장, 부신, 정소, 난소, 비장, 심장, 뇌, 전립선, 갑상선  
· 상피소체, 하수체

\* 비설치류는 전립선, 갑상선·상피소체 및 하수체의 중량을 측정함

12-1-12-7-5-4. 병리조직학적 검사는 비설치류에 대해서는 전동물, 설치류에 대해서는 적어도 대조군 및 최고용량군의 전동물의 기관 또는 조직을 대상으로 한다.

12-1-12-7-5-5. 병리조직학적 검사는 통상 아래에 기재한 기관이나 조직에 대해서 실시하고 육안적 부검 소견 등에 의해 적절하게 추가한다.

12-1-12-7-5-5-1. 피부, 유선, 임파절(경부임파절, 장간막임파절 등), 대동맥, 수액선, 골 및 골수(흉골, 대퇴골), 흉선, 기관, 폐 및 기관지, 심장, 갑상선 및 상피소체, 식도, 위, 소장(십이지장, 공장, 회장), 대장(맹장, 결장, 직장), 간장(담낭 포함), 췌장, 비장, 신장, 부신, 방광, 정낭, 응고선, 전립선, 정소, 정소상체, 난소, 자궁, 질, 뇌, 하수체, 좌골신경, 골격근, 척수(경부, 흉부, 요부), 안구 및 그 부속장기, 기타 육안적으로 변화가 인정되어진 기관 및 조직

12-1-12-7-5-6. 설치류의 최고용량군 이외의 용량군에 대해서도 90일간 반복 경구투여독성시험에서 표적기관, 조직, 본시험에 있어서 육안적으로 병징이 인정되는 부위 또는 고용량군에서 소견이 필요하다고 생각되는 기관, 조직에 대해서는 모든 동물에 대해서 당해기관, 조직의 병리조직학적 검사를 한다.

12-1-12-7-5-7. 설치류의 경우도 모든 동물에 대해서 병리조직학적검사를 하는 것은 평가에 도움이 된다.

12-1-12-7-5-8. 시험종료 후 필요에 따라서 병리조직학적검사를 할 수 있도록 기관 및 조직을 보존한다.

### **12-1-13. 발암성 시험**

12-1-13-1. 본 시험은 시험물질을 장기간 반복투여 했을 때의 발암성유무에 관한 과학적 지식을 얻는 것을 목적으로 한다.

12-1-13-2. 시험물질 : 원제

12-1-13-3. 실험동물

12-1-13-3-1. 2종 이상의 설치류(통상 랫드 및 마우스)를 이용한다.

12-1-13-3-2. 이유 후 순화기간을 거쳐 가능한 한 빠른 시간 내에 동일주령의 동물로서 통상 5~6주령의 동물을 이용한다. 종 및 계통의 선택에 있어서는

감염성 질환에 대한 저항성, 수명, 알려진 발암성물질에 대한 감수성 등의 특성을 고려하여 일반적으로 실험동물로서 널리 사용되고 있는 것으로 정한다. 특히, 자연발생종양의 발생빈도에 관한 데이터가 축적되어 있는 계통을 선택한다.

12-1-13-3-3. 암·수 동수를 이용하되 암컷은 출산 및 임신경험이 없는 것을 이용한다.

12-1-13-4. 투여방법 : 경구를 통한 연속투여를 하되 사료혼입 혹은 음수혼합 투여를 원칙으로 한다. 단, 사료혼입 혹은 음수혼합 투여가 곤란한 경우에는 강제 경구투여를 하여도 좋다.

12-1-13-5. 투여기간 : 시험물질의 투여기간은 동물의 종, 계통의 평균수명을 충분히 고려해서 시험목적을 달성하는데 필요한 기간으로 하되 통상 랫드는 24개월 이상 30개월 이내, 마우스는 18개월 이상 24개월 이내로 한다.

12-1-13-6. 동물수 및 시험군의 설정

12-1-13-6-1. 동물수의 설정

12-1-13-6-1-1. 1군당 암수 각 50마리로 한다.

12-1-13-6-1-2. 각 군의 동물군 분리는 체중층별 등에 의한 적절한 무작위추출법으로 한다.

12-1-13-6-1-3. 동물수는 모든 군에 있어서 그 10% 이상이 카니발리즘(서로 잡아먹는 현상) 등 사육상의 문제로 죽어서는 안된다.

12-1-13-6-1-4. 원칙적으로 랫드(투여개시 후 24개월 시점) 및 마우스(투여개시 후 18개월 시점)의 생존율은 25% 이상이어야 한다. 또한 중간부검을 예정하는 경우는 그에 따른 필요한 수를 추가 설정해야 한다.

12-1-13-6-2. 시험군의 설정

12-1-13-6-2-1. 시험물질투여군

12-1-13-6-2-1-1. 대조군 이외에 적어도 3단계의 용량설정에 의한 투여군을 선정한다.

12-1-13-6-2-1-2. 용량단계는 용량반응관계가 밝혀지도록 설정한다. 또한 용량 설정에 있어서 90일간 반복 경구투여 독성시험의 결과 등을 참고하여야 하고 용량설정의 근거를 제시하여야 한다.

12-1-13-6-2-2. 용량설정

12-1-13-6-2-2-1. 최고용량은 종양이외의 원인으로 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 사망률이 증가하지 않고 독성영향이 인정되는 용량으로 한다. 기술

적으로 투여 가능한 최대용량 또는 1,000mg/kg 체중 상당량으로도 어떤 독성영향이 인정되지 않는 경우는 그 이상의 투여량으로 시험할 필요는 없다.

12-1-13-6-2-2-2. 최저용량: 일반적으로 최저용량은 최고용량의 10%보다 낮아서는 안 된다.

12-1-13-6-2-2-3. 중간용량은 최고용량과 최저용량과의 등비증항을 취하는 것이 바람직하며, 통상 균간의 공비는 2에서 3으로 한다.

12-1-13-6-2-2-4. 기타 발암성 등이 보여지는 경우 추가시험 등에 의해 그 기작을 구명하고 적절한 파라미터에 의한 발암성 무독성량을 결정한다.

12-1-13-6-2-3. 대조군

12-1-13-6-2-3-1. 시험물질을 투여하지 않는 것을 제외한 모든 점을 시험물질 투여군과 동일조건으로 한다.

12-1-13-6-2-3-2. 시험물질 투여시 용매 등을 사용하는 경우에는 투여 용매량이 가장 많은 용량군과 동량의 용매를 투여하여야 한다. 독성에 관한 정보가 충분히 밝혀지지 않은 용매 등을 사용한 경우에는 용매 투여 대조군을 추가한다.

12-1-13-7. 관찰 및 검사

12-1-13-7-1. 일반상태의 관찰

12-1-13-7-1-1. 모든 동물에 대해서 일반상태를 매일 관찰한다.

12-1-13-7-1-2. 정기적으로 체중 및 먹이섭취량을 측정한다(음수 혼합투여의 경우에 있어서 섭취량도 측정한다).

12-1-13-7-1-3. 체중 및 먹이섭취량의 측정은 통상 투여개시 전에 1회, 투여개시 후 3개월까지는 적어도 주 1회 이상, 그 이후는 적어도 4주에 1회의 비율로 실시한다.

12-1-13-7-1-4. 시험물질의 섭취량을 산출한다.

12-1-13-7-2. 혈액검사 : 시험기간 중에 빈사한 동물 및 시험종료시의 모든 생존동물에 대해 도살하여 혈액도말표본을 만들어 흉선, 임파절, 간장, 비장의 종대 등을 조사하고 조혈기종양이 예상되는 경우에는 도말표본을 검색한다.

12-1-13-7-3. 병리학적 검사

12-1-13-7-3-1. 시험기간 중에 사망한 동물은 발견 즉시 부검하여 기관, 조직의 육안적 관찰 및 병리조직학적 검사를 한다. 또한 종양성 병변을 기록할 때 종양발생에 이르는 각종 변화(과형성, 전암병변 등)의 소견도 부가한다(이하 2) 및 3)에 있어서도 같다).

12-1-13-7-3-2. 병리조직학적 검사는 통상 아래에 기재한 기관 또는 조직에 대

해서 실시한다. 육안적부검소견 등에 의해 추가가 필요하다고 판단되는 조직을 검사한다.

12-1-13-7-3-2-1. 피부, 유선, 임파절(경부임파절, 장간막임파절 등), 대동맥, 수액선, 골 및 골수(흉골, 대퇴골), 흉선, 기관, 폐 및 기관지, 심장, 갑상선 및 상피소체, 식도, 위, 소장(십이지장, 공장, 회장), 대장(맹장, 결장, 직장), 간장(및 담낭), 췌장, 비장, 신장, 부신, 방광, 정낭, 응고선, 전립선, 정소, 정소상체, 난소, 자궁, 질, 뇌, 하수체, 좌골신경, 골격근, 척수(경부, 흉부, 요부), 안구 및 그 부속장기, 기타 육안적으로 변화가 인정되어진 기관 및 조직

12-1-13-7-3-3. 시험기간 중에 사망에 임박한 동물은 발견 즉시 도살하여 부검하고 상기 1)과 같은 관찰 및 검사를 수행한다.

12-1-13-7-3-4. 시험종료시 모든 생존동물은 속히 도살 부검하고 기관, 조직의 육안적 관찰을 한다. 대조군 및 고용량군의 모든 동물에 대해서 상기 1)과 같이 병리조직학적 검사를 한다. 단, 최고용량군과 대조군 간에서 종양발생율에 차가 인정되는 기관, 조직의 경우에는 다른 용량군 모든 동물에 대해서도 해당 기관, 조직의 병리조직학적 검사를 한다.

12-1-13-7-3-5. 시험종료 후 필요에 따라서 추가적인 병리조직학적 검사를 할 수 있도록 기관 및 조직을 보존한다.

#### **12-1-14. 만성반복투여경구독성/발암성병합시험 <개정 2010.2.9.>**

12-1-14-1. 본시험은 장기간에 걸쳐 시험물질을 반복 투여했을 때 발현되는 유해 작용을 검출하기 위해 실시하는 시험으로 시험물질의 1년간 반복경구투여 독성과 동시에 발암성에 관한 정보를 얻는 것을 목적으로 한다.

12-1-14-2. 시험물질 : 원제

12-1-14-3. 실험동물

12-1-14-3-1. 설치류 1종(통상 랫드)에 대해서 실시한다. 이유 후 순화기간을 거쳐 가능한 한 빠른 시기의 동일 주령 동물(통상 5~6주령)을 이용한다.

12-1-14-3-2. 종 및 계통의 선택에 있어서는 감염성질환에 대한 저항성, 수명, 알려진 발암성물질에 대한 감수성 등의 특성이 알려져 있어 일반적으로 실험동물로서 널리 사용되는 것으로 정한다. 특히 자연발생종양의 발생빈도에 관한 데이터가 축적되어 있는 것을 선택한다.

12-1-14-3-3. 암·수 동수로 시험하되 암컷은 출산경험이 없고 임신하지 않은 동물을 이용한다.

12-1-14-4. 투여방법 : 경구적으로 연속 투여를 하되 사료혼입투여 혹은 음수혼합투여를 원칙으로 한다. 단 사료혼입 또는 음수혼합투여가 곤란한 경우에는 강제 경구투여를 하여도 된다.

12-1-14-5. 투여기간

12-1-14-5-1. 시험물질의 투여기간은 동물의 종, 계통에 있어서 평균수명을 충분히 고려해서 시험목적에 달성하는데 필요한 기간으로 하되, 통상 랫드는 24개월 이상 30개월 이내, 마우스는 18개월 이상 24개월 이내로 한다.

12-1-14-5-2. 1년간 반복경구투여 독성시험을 위한 위성군 및 그 대조군에 대해서는 원칙적으로 1년 이상으로 한다.

12-1-14-6. 동물수 및 시험군의 설정

12-1-14-6-1. 동물수의 설정

12-1-14-6-1-1. 만성독성 시험을 위해 이용되는 동물수는 1군당 암수 20마리 이상으로 하고, 발암성시험을 위해 이용되는 동물수는 1군당 암수 50마리 이상으로 한다.

12-1-14-6-1-2. 각 군 동물의 분리는 체중층별 등에 의한 적절한 무작위추출법으로 한다.

12-1-14-6-1-3. 동물수는 모든 군에서 그 10% 이상이 카니발리즘(서로 잡아먹는 현상) 등 사육상의 문제로 죽어서는 안 된다.

12-1-14-6-1-4. 원칙적으로 랫드(투여개시후 24개월 시점) 및 마우스(투여개시후 18개월시점)의 생존율은 25% 이상이어야 한다. 또한 중간부검을 예정하는 경우 이에 따른 필요한 수를 추가 설정해야 한다.

12-1-14-6-1-5. 위성군의 동물수는 1군당 암수 각 10마리이상으로 하고, 단 최고 용량군에 대해서는 20마리 이상으로 한다.

12-1-14-6-2. 시험군의 설정

12-1-14-6-2-1. 발암성 시험을 위한 용량단계 : 대조군외에 적어도 3단계의 투여군을 두고 위성군 및 그 대조군을 둔다. 각 용량단계는 용량반응관계가 밝혀질 수 있도록 설정한다. 또한 용량설정에는 있어서는 90일간 반복경구투여독성시험의 결과 등을 참고로 하고 용량설정의 근거를 제시해야 한다.

12-1-14-6-2-1-1. 최고용량은 종양이외의 원인으로 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 사망률이 증가하지 않고 독성영향이 인정되는 용량으로 한다. 기술적으로 투여가능한 최대량은 1,000mg/kg/day 상당량으로도 어떠한 독성영향도 인정되지 않을 경우 그 이상의 투여량으로 시험할 필요는 없다.

12-1-14-6-2-1-2. 일반적으로 최저용량은 최고용량의 10%보다 낮아서는 안 된다.

12-1-14-6-2-1-3. 중간용량 : 최고용량과 최저용량의 등비중항을 취하는 것이 바람직하다. 통상, 군간의 공비는 2에서 3으로 한다.

12-1-14-6-2-1-4. 기타 발암성 등이 보여지는 경우에 추가시험 등에 의해 그 기작을 구명하고 적절한 파라메타에 의한 발암성관련 무독성량을 결정한다.

12-1-14-6-2-2. 1년간 반복경구투여독성시험을 위한 용량단계

12-1-14-6-2-2-1. 대조군외에 적어도 3단계의 용량설정에 의한 투여군을 설계한다.

12-1-14-6-2-2-2. 용량단계는 시험물질의 독성증상을 명확히 밝히고 무독성량 추정이 가능하도록 설정한다. 최고용량은 다수의 사망은 일으키지 않으나 독성영향이 인정되어지는 용량, 최저용량은 아무런 독성영향도 인정되지 않는 용량으로 하고 용량반응관계가 밝혀질 수 있도록 각 용량단계를 설정한다.

12-1-14-6-2-2-3. 용량설정은 90일간 반복경구투여독성시험의 결과 등을 참고하여 선정한다. 또한 용량설정의 근거를 제시해야 한다.

12-1-14-6-2-2-4. 기술적으로 투여 가능한 최대량 또는 1,000mg/kg/day 상당량에서 어떠한 독성증상도 인정되지 않을 경우 그 이상의 투여량으로 시험할 필요는 없다.

12-1-14-6-2-3. 대조군

12-1-14-6-2-3-1. 시험물질 투여를 하지 않는 것 이외 모든점에서 시험물질투여군과 동일조건으로 한다.

12-1-14-6-2-3-2. 시험물질 투여에 용매 등을 사용하는 경우에는 투여용매량의 가장 많은 용량군과 동량의 용매를 투여한다.

12-1-14-6-2-3-3. 독성에 관한 정보가 충분히 밝혀지지 않은 용매 등을 사용하는 경우에는 용매투여 대조군을 추가한다.

12-1-14-7. 관찰 및 검사

12-1-14-7-1. 일반상태의 관찰

12-1-14-7-1-1. 모든 동물에 대해서 일반상태를 매일 관찰한다.

12-1-14-7-1-2. 정기적으로 체중 및 먹이섭취량을 측정한다(음수혼합투여의 경우에 있어서는 섭취량도 측정한다).

12-1-14-7-1-3. 체중 및 먹이섭취량의 측정은 통상 투여개시전 1회, 투여개시후는 3개월까지는 적어도 주 1회, 그 이후는 적어도 4주에 1회의 비율로 한다.

12-1-14-7-1-4. 시험물질의 섭취량을 산출한다.

12-1-14-7-2. 혈액검사

12-1-14-7-2-1. 발암성시험을 위한 용량군에서는 시험기간중에 빈사한 동물 및 시험종료시 모든 생존동물에 대해서 혈액도말표본을 제작하고 흉선, 임파절, 간장, 비장의 종대 등, 조혈기종양이 예상 되어지는 경우에는 도말표본을 검색한다.

12-1-14-7-2-2. 1년간 반복경구투여독성시험을 위한 위성군에서는 투여개시후 6개월 및 시험 종료시에 각 군 암수 각 10마리 이상에 대해서 채혈하고 혈액학적검사 및 혈액생화학검사를 실시한다.

12-1-14-7-2-3. 마우스를 제외하고는 검사전에 하룻밤 절식시키는 것이 바람직하다.

12-1-14-7-2-4. 위성군에 대해서는 통상 아래 항목에 대해서 검사하지만 그 외에 시험마다 적절한 검사항목을 추가 선정하여 행한다. 또한 검사항목 및 검사방법은 국제적으로 널리 채택하고 있는 것을 선정한다.

12-1-14-7-2-4-1. 혈액학적 검사 : 적혈구수, 백혈구수, 혈액상(백혈구형별 백분율), 혈소판수, 혈색소량, 헤마토 크리치, 기타 필요에 따라서 망상적혈구수, 응고능(프로톰빈 시간, 활성화부분 트론보프라스틴 시간) 등

12-1-14-7-2-4-2. 혈액생화학적 검사 : 혈청(혈장), 총단백, 알부민, A/G비, 포도당, 콜레스테롤, 트리글리세이드, 비리루빈, 요소질소, 크레아티닌, 트랜스아미나제 [AST(GOT), ALT (GPT)].  $\gamma$ -GPT, 알칼리포스파타제, 전해질(나트륨, 칼륨, 염소, 칼슘, 무기인 등) 등

12-1-14-7-3. 소변검사

12-1-14-7-3-1. 1년간 반복경구투여독성검사를 위한 위성군의 각군 암수 각 10마리이상에 대해서 혈액검사와 동시에 뇨검사를 한다.

12-1-14-7-3-2. 혈액검사 대상으로 된 동물에 대해서 실시하는 것이 바람직하다.

12-1-14-7-3-3. 통상 다음 항목에 대해서 실시한다. : 소변량, pH, 단백질, 당, 케톤체, 비리루빈, 유로비리노겐, 잠혈(대변에 섞인 소량의 혈액), 침사, 비중 등

12-1-14-7-4. 안과학적 검사 : 1년간 반복경구투여 독성시험을 위한 위성군의 고용량군과 대조군에 대해서 투여개시전과 시험 종료 후에 행한다. 혹시 시험물질투여 의해 변화가 생긴 경우에는 모든 동물을 검사한다.

#### 12-1-14-7-5. 병리학적 검사

12-1-14-7-5-1. 시험기간 중에 사망한 동물은 발견 즉시 부검하여 기관, 조직의 육안적 관찰 및 병리조직학적 검사를 한다. 사인(死因) 및 그 시점에서 독성 변화의 정도를 명확히 밝히도록 노력한다. 또한 종양성 병변의 기재에 관해서는 종양발생에 이르는 각종변화(과형성, 전암병변 등)의 소견도 부가할 필요가 있다.

12-1-14-7-5-2. 투여기간중 사망에 임박한 동물은 발견 즉시 도살 후 부검하고 1)과 같은 사항의 관찰 및 검사를 한다. 빈사상태에 이른 이유와 그 시점에서의 독성변화과정을 구명하도록 노력한다.

12-1-14-7-5-3. 병리조직학적검사는 통상 아래에 기재한 기관 또는 조직에 대해서 실시하고 또한 육안적 부검소견 등에 의해 적절하게 추가한다.

12-1-14-7-5-3-1. 피부, 유선, 임파절(경부임파절, 장간막임파절 등), 대동맥, 수액선, 골 및 골수(홍골, 대퇴골), 흉선, 기관, 폐 및 기관지, 심장, 갑상선 및 상피소체, 식도, 위, 소장(십이지장, 공장, 회장), 대장(맹장, 결장, 직장), 간장(및 담낭), 췌장, 비장, 신장, 부신, 방광, 정낭, 응고선, 전립선, 정소, 정소상체, 난소, 자궁, 질, 뇌, 하수체, 좌 골신경, 골격근, 척수(경부, 흉부, 요부), 안구 및 그 부속장기, 기타 육안적으로 변화가 인정되어진 기관 및 조직

12-1-14-7-5-4. 발암성시험을 위한 용량군 및 1년간 반복경구투여독성시험을 위한 위성군에 대해서는 시험종료시에 모든 생존동물을 즉시 도살하여 부검하고, 기관, 조직의 육안적 관찰을 한다. 또한 위성군에서는 모든 동물에 대해서 통상 아래 기재한 기관의 중량을 측정한다. 마우스를 제외하고 부검 전에 1일 밤 절식시키는 것이 바람직하다.

12-1-14-7-5-4-1. 간장, 신장, 부신, 정소, 난소, 비장, 심장, 뇌

12-1-14-7-5-5. 병리조직학적 검사는 대조군 및 최고용량군의 모든 동물에 대해서 위의 1)과 같이 실시한다. 단 대조군 및 최고용량군 간에 종양발생율에 차이가 인정되어진 기관, 조직, 90일간 반복경구투여독성시험에서의 표적기관, 조직, 본시험에서의 육안적인 병변이 인정되는 부위 또는 고용량군에서의 소견이 필요하다고 생각되어지는 기관, 조직에 대해서는 모든 동물의 해당기관, 조직의 병리조직학적 검사를 한다. 또한 그 외의 동물에 대한 병리조직학적검사를 하는 것이 바람직하다.

12-1-14-7-5-6. 시험 종료 후 필요시 추가적인 병리조직학적검사를 할 수 있도록 기관 및 조직을 보존한다.

## 12-1-15. 번식독성시험

12-1-15-1. 본 시험은 시험물질을 2대(제1세대(P) 및 제2세대(F1))에 걸쳐서 투여하고 발정주기, 교미, 수태, 분만, 포육 등의 번식기능 및 출생아의 생육에 미치는 영향에 관한 과학적 지식 획득을 목적으로 한다.

12-1-15-2. 시험물질 : 원제

12-1-15-3. 공시동물

12-1-15-3-1. 설치류 1종 이상(통상 랫드)을 이용한다.

12-1-15-3-2. 공시동물의 계통선택에 있어서는 수태율(새끼를 배는 비율)이 낮은 계통은 피하고 일반독성시험이나 번식독성시험에 통상적으로 이용되는 계통을 택한다.

12-1-15-4. 투여방법

12-1-15-4-1. 경구에 의한 연속투여로 하고 통상 사료혼입투여 혹은 음수혼합투여에 의한다. 사료혼입 또는 음수혼합에 의한 투여가 곤란한 경우에는 강제경구투여를 하여도 좋다.

12-1-15-4-2. 투여량은 각 주별로 각 개체의 체중에 근거하여 산출한다. 단, 임신기의 암컷동물에 대해서는 임신 0일 및 임신 6일의 체중을 근거로 투여량을 결정하여도 좋다.

12-1-15-5. 투여기간

12-1-15-5-1. 제1세대(P) : 적어도 5일 이상 순화시킨 후 5~9주령째부터 투여를 개시하고 교배할 때까지 10주간 이상 투여한다. 그 후 수컷은 교배가 종료될 때까지, 암컷은 F<sub>1</sub>새끼를 이유할 때까지 투여를 계속한다.

12-1-15-5-2. 제2세대(F<sub>1</sub>) : 이유 시점부터 투여를 개시하고 교배할 때까지 10주간 이상 연속 투여한다. 그 후 수컷은 적어도 교배가 종료될 때까지, 암컷은 F<sub>2</sub> 새끼를 이유할 때까지 투여를 계속한다.

12-1-15-6. 동물수 및 시험군의 설정

12-1-15-6-1. 동물수의 설정 : 시험에 이용되는 동물수는 암수 동수를 원칙으로 하고 1군당 20마리 이상의 임신동물이 얻어지는 만큼의 수로 한다.

12-1-15-6-2. 시험군의 설정

12-1-15-6-2-1. 최소한 3단계의 용량설정에 의한 투여군을 설계한다.

12-1-15-6-2-2. 용량단계는 시험물질의 독성증상을 명확히 밝히고 무독성량 추정이 가능하도록 설정한다. 최고용량은 어미동물 또는 새끼동물에 체중 증가

또는 억제 등 독성영향이 인정되지만 죽음에 이르지 않는 용량, 최저용량은 어미동물 또는 새끼동물에 아무런 독성영향이 인정되지 않는 용량으로 하고 용량반응관계가 보여지도록 각 용량단계를 설정하며, 또한 용량설정 근거를 제시하여야 한다.

12-1-15-6-2-3. 또한 기술적으로 투여가능한 최대량 또는 1,000mg/kg/day 상당량에서 아무런 독성영향도 인정되지 않을 경우에는 그 이상의 투여량으로 시험할 필요는 없다.

12-1-15-6-3. 대조군

12-1-15-6-3-1. 시험물질을 투여하지 않는 것을 제외한 모든 점은 시험물질 투여군과 동일조건으로 한다.

12-1-15-6-3-2. 시험물질의 투여에 용매 등을 사용하는 경우에는 투여 용매량의 가장 많은 용량군과 동량의 용매를 투여한다.

12-1-15-6-3-3. 독성에 관한 정보가 충분히 밝혀지지 않은 용매 등을 사용하는 경우에는 용매 투여 대조군을 추가한다.

12-1-15-7. 교배, 동복아수(同腹兒數)의 조정 및 제2세대(F<sub>1</sub>)의 선발

12-1-15-7-1. 제1세대(P)

12-1-15-7-1-1. 같은 용량군의 암수를 1 : 1로 동거시켜 교미가 확인될 때까지 교배시킨다. 동거기간은 2주 이내로 한다.

12-1-15-7-1-2. 암컷 동물에 대해서는 매일 아침 질내의 정자 혹은 질전(臙栓)의 유무를 확인하여 자 또는 질전이 확인된 날을 임신 0일로 한다.

12-1-15-7-1-3. 필요에 따라서 1세대에 이어 2세대의 새끼를 얻는 것도 고려한다.

12-1-15-7-1-4. 동복아는 이유할 때까지 포육시킨다. 동복아수를 조정할 필요가 있는 경우는 생후 4일에 암수 각 4마리가 되도록 하고 나머지의 신생아를 무작위로 제거한다. 1복당 암수 각 4마리로 조정하는 것이 불가능할 때는 총수 8마리(예를들면 수컷 5마리와 암컷 3마리)로 조정해도 된다. 그러나 동복아가 8마리 이하의 경우에는 조정하지 않는다.

12-1-15-7-1-5. F<sub>1</sub>의 이유시에 각군 모두 가능한 한 많은 어미 동물로부터 암수 각 1마리 또는 2마리를 교배용으로서 선발한다.

12-1-15-7-2. 제2세대(F<sub>1</sub>) : 제1세대와 동일하게 교배 및 동복아수의 조정을 한다. 교배시 동복아의 교배는 피한다.

12-1-15-8. 관찰 및 검사

## 12-1-15-8-1. 어미동물

### 12-1-15-8-1-1. 일반상태

12-1-15-8-1-1-1. 제1세대 및 교배용 제2세대 동물에 대해서 일반상태를 매일 관찰한다. 번식기의 암컷에 대해서는 임신, 분만상태도 관찰한다.

12-1-15-8-1-1-2. 일반상태는 생사, 외관, 흥분, 경련, 진정, 보행이상 등을 관찰한다. 임신, 분만 상태는 유산, 조산, 분만지연 등을 관찰한다.

### 12-1-15-8-1-2. 체중 및 먹이섭취량

12-1-15-8-1-2-1. 제1세대 및 교배용 제2세대 동물에 대해서 정기적으로 체중 및 먹이섭취량을 측정한다(음수 혼합투여의 경우에는 있어서는 섭취량도 측정한다). 또한 체중 및 먹이섭취량의 측정은 통상 투여개시일 1회, 투여개시 후에는 적어도 주 1회의 비율로 한다.

12-1-15-8-1-2-2. 번식기간중의 암컷에 대해서는 임신 0, 7, 14, 21일과 포육 0, 7, 14, 21일에 측정한다.

12-1-15-8-1-2-3. 시험물질의 섭취량을 산출한다.

12-1-15-8-1-3. 성성숙의 관찰 : 교배용 제2세대 동물에 대해서 외부생식기의 발육상태를 조사한다.

12-1-15-8-1-4. 발정주기 : 제1세대 및 교배용 제2세대 암컷에 대해서 교배 전에 2주간이상 발정주기를 조사한다. 필요하다면 제3세대(F<sub>2</sub>)암컷의 발정주기도 조사한다.

### 12-1-15-8-1-5. 임신, 출산 및 포육

12-1-15-8-1-5-1. 암수의 교미동물수, 임신동물수(임신시켜 얻은 암컷수 포함), 출산모체수 및 이유새끼수를 근거로 이하의 값을 산출한다.

$$\bigcirc \text{ 교미율} = \text{교미한 동물수} / \text{교배에 이용한 동물수} \times 100$$

$$\bigcirc \text{ 수태율} = \text{임신동물수} / \text{교미한 암컷동물수} \times 100$$

$$\bigcirc \text{ 출산율} = \text{생존아출산암컷수} / \text{임신암컷수} \times 100$$

$$\bigcirc \text{ 이유율} = \text{이유시의 생존새끼수} / \text{생후 4일에 조정된 새끼수} \times 100$$

12-1-15-8-1-5-2. 교미하지 못한 암수동물에 대해서는 그 원인을 조사한다

12-1-15-8-1-6. 정자검사 : 제1세대 및 교배용 제2세대 수컷에 대해서 도살시에 정소의 정자세포수 및 정소상피 중의 정자의 수, 운동성, 형태 등을 조사한다.

## 12-1-15-8-2. 새끼동물

12-1-15-8-2-1. 출산 후 바로 각 어미들의 출산아수, 사산아수, 생존아수, 아동

물의 외표이상의 유무 및 성을 조사하고 체중을 측정한다. 필요한 경우 항문  
· 생식결절간 거리(AGD:Anogenital Distance)를 측정한다.

12-1-15-8-2-2. 생후 4, 7, 14 및 21일에 생존아수를 조사하여 생존율을 산출함  
과 동시에 개체마다 체중을 측정한다.

12-1-15-8-2-3. 그 외에 일반상태를 관찰한다.

12-1-15-8-3. 병리학적 검사

12-1-15-8-3-1. 제1세대 및 교배에 이용한 제2세대 동물은 각각의 출생아의 이  
유 후 곧바로 도살하고 교배용으로 선발 되지 않은 제1세대 및 제2세대 동물  
은 이유 후 즉시 도살하되 부검할 때에 생식기 계통 기관의 이상유무를 주의  
깊게 살피면서 육안적 관찰을 한다.

12-1-15-8-3-2. 교배에 이용한 암컷의 자궁에 대해서는 착상흔 수를 조사한다.  
시험기간중 사망한 개체는 발견즉시 부검하고 사인을 조사한다. 시험기간 중  
에 빈사한 동물에 대해서도 즉시 부검하고 그 원인을 조사한다.

12-1-15-8-3-3. 중량측정은 통상 아래의 기관에 대해서 실시한다.

12-1-15-8-3-3-1. 어미동물 : 난소, 자궁, 정소, 정소상체, 정낭, 응고선, 전립선,  
뇌, 간장, 신장, 부신, 비장, 하수체, 갑상선 기타 표적 장기

12-1-15-8-3-3-2. 이유한 새끼 : 뇌, 비장, 흉선 및 자궁

12-1-15-8-3-4. 제1세대 및 교배에 이용한 제2세대 동물의 고용량군과 대조군  
에 대해서 생식기 계통의 기관과 표적기관의 병리조직학적 검사를 실시한다.  
시험물질투여에 의한 영향이라고 판단되는 이상이 관찰된 경우 중간용량군과  
저용량군에 대해서도 같은 검사를 실시한다. 새끼동물에 대해서도 시험물질  
투여의 영향이라고 판단되는 육안적이상이 관찰된 기관과 조직에 대해서 병  
리조직학적검사를 실시한다. 반복투여독성시험의 결과를 참고한다.

12-1-15-8-3-5. 시험종료 후 병리조직학적 검사가 가능하도록 어미동물 및 새끼  
동물의 생식기계의 기관을 중심으로 보존한다.

## **12-1-16. 동물체내대사시험 <개정 2010.2.9.>**

12-1-16-1. 본 시험은 시험물질을 동물에 투여한 후 시험물질이 체내 대사(흡  
수, 분포, 배설, 대사 등)에 관한 과학적 지식을 얻는 것을 목적으로 한다.

12-1-16-2. 시험물질 : 농약 유효성분 등의 방사성동위원소로 표지 또는 비표지  
된 고순도 화합물을 이용한다. 입수처, 순도, 안정성 등이 명확하여야 하고,  
또한 동위원소표지물질에 대해서는 합성법, 표지된 방사성종류, 표지위치 및

비방사능에 대해서도 명확히 밝혀야 한다.

#### 12-1-16-3. 실험동물

12-1-16-3-1. 1종류 이상(통상 랫드)의 성숙초기동물을 이용한다.

12-1-16-3-2. 1년간 반복투여경구독성시험 또는 발암성시험에 사용된 것과 동일한 계통의 동물을 이용하는 것이 바람직하다.

12-1-16-3-3. 원칙적으로 암수동물을 같이 이용한다.

12-1-16-3-4. 설치류와 비설치류에서 표적장기 및 임상증상이 현저한 차이가 인정될 경우 일부시험항목에 대하여 비설치류를 추가하는 것이 바람직하다. 필요한 경우에는 임신동물을 이용한다.

#### 12-1-16-4. 투여방법

12-1-16-4-1. 투여경로 : 경구투여를 원칙으로 하되, 필요에 따라서 정맥내투여 등에 의한 시험으로도 수행할 수 있다.

12-1-16-4-2. 투여횟수 및 기간 : 단회 투여를 원칙으로 하되, 축적성이 예상될 때는 반복투여로 수행할 것인지에 대하여 검토한다. 또한 반복투여의 경우 시험물질이 체내의 평형상태, 축적성 등을 추정하여 얻을 수 있는 충분한 투여간격(통상 1일 1회)과 기간(최대 14일)으로 한다.

#### 12-1-16-5. 동물수 및 시험군의 설정

12-1-16-5-1. 동물수의 설정 : 동물수는 원칙적으로 각 용량군당 4마리로 하고, 개체차이, 관찰·측정시점에서의 필요검체수 등을 고려하여 시험목적에 따라 증가한다.

#### 12-1-16-5-2. 시험군의 설정

12-1-16-5-2-1. 단회투여에서는 적어도 2용량으로 한다. 2단계의 용량설정에 있어서 고용량은 독성에 의한 임상증상이 관찰되는 농도로 하고, 저용량은 독성에 의한 임상증상이 관찰되지 않는 농도여야 한다.

12-1-16-5-2-2. 반복투여는 원칙적으로 저용량으로 수행하되 필요에 따라 고용량으로도 수행할 수 있다.

#### 12-1-16-6. 검토항목

12-1-16-6-1. 흡수 : 시험물질의 흡수량 및 흡수속도에 관한 정보를 구한다. 이것들은 배설량 및 혈중농도(혈청중 농도, 혈장중농도 및 전혈중농도) 등으로 부터 산출할 수 있다.

12-1-16-6-2. 분포 : 주요기관 및 조직(독성증상이 관찰되는 기관 및 조직 포함)의 시험물질 및 대사물의 분포(농도 및 분포율), 투여 후 T-max 및 배설의 최종시

점을 포함한 적당한 측정시점에서의 분포, 경시변화 및 축적성에 관한 정보를 구명한다.

12-1-16-6-3. 배설 : 시험물질 및 대사물의 분뇨 및 호기(呼氣)에 의한 배설량을 측정하고, 이들로부터 총배설량, 배설경로, 배설정도 및 배설속도에 관한 정보를 얻는다. 배설량의 측정은 투여후 7일간 또는 적어도 투여량의 90%가 배설될 때까지 수행한다. 필요할 경우 담즙 및 유즙에 대한 배설량도 측정한다.

12-1-16-6-4. 대사 : 시험물질 및 대사산물에 대한 동정 및 정량을 수행하여 대사경로, 대사의 정도 및 속도에 관한 성적을 구한다.

12-1-16-6-5. 기타 : 생체고분자와 결합 등 독성에 관련이 있을 수 있는 각종 사항, 대사에 관여하는 기관 및 조직 등의 해명에 대해서 가능한 한 상세히 조사하는 것이 바람직하다.

## **12-1-17. ~ 12-1-17-5-2-5. 삭제 <2010.2.9.>**

## **12-1-18. 농약 살포자 노출량 측정시험 <신설 2009.7.7., 개정 2010.2.9., 2018.12.17. 2026. 5. 6>**

12-1-18-1. 목적: 농약살포자에 노출되는 농약의 양을 측정하는 것을 목적으로 하며, 살포농약을 조제하고 살포하는 과정에서 피부 및 호흡을 통한 노출량을 측정한다. <개정 2026. 5. 6.>

12-1-18-1-1. <삭제 2026.00.00.>

12-1-18-2. 시험방법 <개정 2026. 5. 6.>

12-1-18-2-1. 이론적 노출량: 이론적 농약노출량 산정모델 활용 농약 노출량 산정

12-1-18-2-2. 살포농약 조제시 피부노출량: 야외 포장조건에서 살포농약 조제시 피부 노출량 측정

12-1-18-2-3. 살포농약 살포시 피부 노출량: 야외 포장조건에서 살포농약 살포시 피부 노출량 측정(전신복장법)

12-1-18-2-4. 호흡 노출량: 야외 포장조건에서 살포농약 조제 및 살포시 호흡 노출량 측정(IOM 채집기법, 흡착제튜브법)

12-1-18-3. 1단계: 농약살포자에 대한 이론적 농약노출량 산정법 <개정 2026. 5. 6.>

12-1-18-3-1. 시험목적: 농약노출량 산정모델을 활용하여 농약살포자의 살포농약 조제 및 살포시 노출량을 평가한다.

12-1-18-3-2. 이론적 농약노출량 계산방법

12-1-18-3-2-1. 액상품목: 총 노출량은 살포농약 조제시 피부노출량, 살포농약 살포시 피부노출량 및 호흡노출량의 합으로 한다.

12-1-18-3-2-1-1. 조제빈도는 과수 6회, 비과수 3회로 한다.

12-1-18-3-2-1-2. 살포시간은 하루 4시간, 피부흡수율은 10%로 한다.

12-1-18-3-2-1-3. 살포농약 조제시 피부노출량

- 노출량(mg/일) = 피부노출량(mL/일) × 투과율(%) × 유효성분 함량(mg/mL) × 피부흡수율(%) × 조제 빈도
- 살포농약 조제시 피부노출량은 손 노출량으로 평가하며, 장갑 착용 유무에 따라 다음표의 피부노출량과 보호복 투과율을 적용한다.

구분	피부 노출량 (mL/일)	보호복 투과율 (%)		피부 흡수율(%)
		장갑 미착용	장갑 착용	
물 기반 (액상수화제 등)	0.01	100	5	10
용제 기반 (유제 등)	0.01	100	10	10

12-1-18-3-2-1-4. 살포농약 살포시 피부노출량

- 노출량(mg/day) = [피부노출량(mL/시간) × 분포(%) × 보호복 투과율(%) ] × 살포시간(시간/일) × 제품사용량(L/ha) × 유효성분함량(mg/mL) / 살포물량(L/ha) × 피부흡수율(%)
- 피부노출량, 분포, 보호복 투과율은 살포기기 및 보호복 착용 유무에 따라 다음표의 값을 적용한다. 단, 손에 대한 피부노출량[피부노출량(mL/시간) × 분포(%) × 보호복 투과율(%) ]이 10mL/시간 이하일 경우 그 값을 적용하고, 이상일 경우는 10mL/시간을 적용한다.

살포 기기	피부 노출량 (mL/시간)	분포(%)			보호복 투과율(%)					
					보호복 미착용			보호복 착용		
		손	몸통	다리	손	몸통	다리	손	몸통	다리
SS기	400	10	65	25	100	2	5	10	2	5
동력분무기 상향	50	10	65	25	100	15	20	10	5	5
동력분무기 하향	20	10	5	85	100	5	20	10	5	5

12-1-18-3-2-1-5. 살포농약 살포시 호흡노출량

- 노출량(mg/day) = [호흡노출량(mL/시간) × 살포시간(시간/일) × 제품사용량(L/ha) × 유효성분함량(mg/mL) / 살포물량(L/ha) × 호흡흡수율(%)
- 살포시 호흡노출량은 살포기기에 따라 다음표의 호흡 노출량과 흡수율을 적용한다.

살포기기	호흡 노출량 (mL/시간)	호흡습수율(%)
SS기	0.05	100
동력분무기 상향	0.01	100
동력분무기 하향	0.01	100

12-1-18-3-2-2. 총 노출량은 살포농약 조제시 피부 및 호흡노출량과 살포농약 살포시 피부 및 호흡노출량의 합으로 한다.

12-1-18-3-2-2-1. 작업량은 하루에 SS기 2ha, 동력분무기는 1ha로 한다.

12-1-18-3-2-2-2. 살포시간은 하루 4시간, 피부흡수율은 10%로 한다.

12-1-18-3-2-2-3. 살포농약 조제시 피부노출량

- 노출량(mg/일) = 피부노출량(mg/kg A.I) × 제품사용량(L/ha) × 투과율(%) × [유효성분 함량(mg/g)/1000] × 작업량(ha/일) × 피부흡수율(%)
- 살포농약 조제시 피부노출량은 손 노출량으로 평가하며 피부노출량과 투과율은 살포기기 및 보호복 착용유무에 따라 다음표의 값을 적용한다.

성상	피부노출량 (mg/kg A.I)		보호복 투과율 (%)		피부 흡수율(%)
	SS	동력 분무기	장갑 미착용	장갑 착용	
입상수화제 등 (granule)	5.72	171.4	100	1	10
수화제 등 (powder)	13.6	171.4	100	1	10

12-1-18-3-2-2-4. 살포농약 조제시 호흡노출량

- 노출량(mg/일) = 호흡노출량(mg/kg A.I) × 제품사용량(L/ha) × 투과율(%) × [유효성분 함량(mg/g)/1000] × 작업량(ha/일) × 호흡습수율(%)
- 살포농약 조제시 호흡노출량과 투과율은 제형성상, 살포기기, 보호복 착용 유무에 따라 다음표의 값을 적용한다.

성상	호흡노출량 (mg/kg A.I)		보호복 투과율 (%)		호흡 습수율(%)
	SS	동력 분무기	보호구 미착용	보호구 착용	
입상수화제 등 (granule)	0.242	0.0628	100	10	100
수화제 등 (powder)	0.659	1.534	100	10	100

12-1-18-3-2-2-5. 살포농약 살포시 피부노출량

- 노출량(mg/day) = [피부노출량(mL/시간) × 분포(%) × 보호복 투과율(%)] × 살포시간(시간/일) × 제품사용량(L/ha) × 유효성분함량(mg/mL) / 살포물량(L/ha) × 피부흡수율(%)
- 피부노출량, 분포, 보호복 투과율은 살포기기 및 보호복 착용 유무에 따라 다음표의 값을 적용한다. 단, 손에 대한 피부노출량[피부노출량(mL/시간) × 분포(%) × 보호복 투과율(%)]이 10 mL/시간 이하일 경우는 그 값을 적용하고, 이

상일 경우는 10 mL/시간을 적용한다.

살포 기기	피부 노출량 (mL/시간)	분포(%)			보호복 투과율(%)					
					보호복 미착용			보호복 착용		
		손	몸통	다리	손	몸통	다리	손	몸통	다리
SS기	400	10	65	25	100	2	5	10	2	5
동력분무기 상향	50	10	65	25	100	15	20	10	5	5
동력분무기 하향	20	10	5	85	100	5	20	10	5	5

12-1-18-3-2-2-6. 살포농약 살포시 호흡노출량

- 노출량(mg/day) = [호흡노출량(mL/시간) × 살포시간(시간/일) × 제품사용량(L/ha) × 유효성분함량(mg/mL) / 살포물량(L/ha) × 호흡흡수율(%)]
- 살포농약 살포시 호흡노출량은 살포기기에 따라 다음표의 호흡노출량과 흡수율을 적용한다.

살포기기	호흡 노출량 (mL/시간)	호흡흡수율(%)
SS기	0.05	100
동력분무기 상향	0.01	100
동력분무기 하향	0.01	100

12-1-18-4. 2단계: 야외 포장조건에서의 살포농약 조제시 피부노출량산정 <개정 2026. 5. 6.>

12-1-18-4-1. 시험목적: 살포농약을 조제할 때 농약살포자의 피부에 노출되는 농약의 양을 측정하는 것을 목적으로 한다.

12-1-18-4-2. 시험농약: 품목

12-1-18-4-3. 시험시기: 실험하고자 하는 농약을 사용하는 시기

12-1-18-4-4. 노출량 측정

12-1-18-4-4-1. 고상품목: 손세척액, 장갑세척액, 머리(얼굴/목)

12-1-18-4-4-2. 액상품목: 손세척액, 장갑세척액

12-1-18-4-5. 시험방법

12-1-18-4-5-1. 농약조제

12-1-18-4-5-1-1. 조제방법: 살포농약을 조제하는 관행적인 사용방법에 따르며 3반복으로 수행한다. 이 경우 스피드스프레이어는 1000리터 이상 1회 또는 500리터 이상 2회 조제를 1반복으로 본다. 동력분무기의 경우에는 과수와 채소의 경우 250리터 이상 2회, 기타 작물인 경우에는 120리터 이상 2회 조제를 1반복으로 본다.

12-1-18-4-5-1-2. 조제농도: 적용대상 병해충의 방제를 위해 농약관리법 시행령 제19조(농약등의 안전사용기준)에 따라 정해진 사용량에 적합하게 조제한다.

12-1-18-4-5-1-3. 장갑: 장갑은 시험 종료까지 본래의 상태를 유지할 수 있고 화학물질에 저항성을 갖는 나이트릴 재질의 장갑을 사용한다.

## 12-1-18-4-5-2. 농약추출

12-1-18-4-5-2-1. 세척액: 계면활성제 수용액(예;0.01% 에어로졸 OT-75 수용액) 또는 아이소프로판올 및 에탄올 중 순도가 높은 것을 사용하며, 수용성 농약인 경우에는 증류수를 사용한다.

12-1-18-4-5-2-2. 장갑: 장갑은 시험이 끝난 직후 세척액으로 장갑 표면을 2분 이상 충분히 세척한 후 세척액을 시료보관 용기에 담아 즉시 실험실로 운반한다. 이 후 필요시 적절한 양의 유기용매로 분배한 다음 농축 후 분석한다. 장갑 세척액의 용량은 1회 500 mL로 하고 2회 수행한다.

12-1-18-4-5-2-3. 손: 손이 장갑표면에 묻지 않게 장갑을 뒤집어 벗은 후, 손을 세척액으로 2분 이상 충분히 세척한 후 세척액을 시료보관 용기에 담아 즉시 실험실로 운반한다. 필요시 적절한 양의 유기용매로 분배한 다음 농축 후 분석한다. 손 세척액의 용량은 1회 500 mL로 하고 2회 수행한다.

12-1-18-4-5-2-4. 머리(얼굴/목): 머리의 농약 노출 측정을 위해 거즈(10×10 cm, 두께 1-2 mm) 2장을 겹쳐 사용한다. 세척액 4 mL로 적신 거즈를 이용하여 조제자의 얼굴과 목을 충분히 1회 닦고, 거즈를 시료보관 용기에 담아 즉시 실험실로 운반한다. 필요시 적절한 양의 유기용매로 추출한 다음 농축 후 분석한다.

12-1-18-4-5-2-5. 모든 시료는 포장시험 종료 후 24시간 이내에 분석해야 한다. 24시간 이내에 분석이 완료되지 않을 경우 저장안정성을 시험을 통해 농약의 안정성을 확인하여야 한다. 단, 시험농약의 안정성이 이미 검증된 경우, 이전 시험의 결과값을 적용할 수 있다.

## 12-1-18-4-5-3. 시험법

12-1-18-4-5-3-1. 저장안정성 시험: 저장기간 동안 농약의 안정성을 검증하기 위해 사용하지 않은 노출측정용 시료(거즈, 세척액)에 표준용액을 첨가하고 노출시험 후 수거한 시료와 동일한 방법과 조건으로 저장한 다음 기기분석 후 분석농도와 첨가농도를 비교한 값을 회수율 퍼센트(%)로 나타낸다. 첨가농도는 정량한계 농도 10배 농도로 하고 3반복 수행한다.

12-1-18-4-5-3-2. 검출한계 시험: 시료 중 분석물질을 검출할 수 있는 가장 낮은 농도로 정량한 값의 정확성을 보장할 수는 없으나 시료 중 분석물질의 존재 가능성을 측정할 수 있는 최소한의 농도를 뜻한다. 검출한계는 무처리 시료에 표준품을 처리하여 분석한 크로마토그램 상 시그널노이즈비가 3-5배인 값으로 한다.

12-1-18-4-5-3-3. 정량한계 시험: 시료 중 분석물질을 정량할 수 있는 가장 낮은 농도로 무처리 시료에 표준품을 처리하여 분석한 크로마토그램 상 시그널노이즈비가 6-10배 이상 값으로 한다.

12-1-18-4-5-3-4. 재현성 시험: 분석기기의 안정성 검증을 위해 표준용액의 크

로마토그램 면적의 평균값을 비교하여 나타낸다. 분석농도는 정량한계 및 정량한계 2-10배 수준의 2개 농도로 하고 3반복 수행한다.

12-1-18-4-5-3-5. 회수율 시험: 분석방법의 검증은 검증을 위해 사용하지 않은 노출측정용 시료(거즈, 세척액)에 표준용액을 첨가하고 시료 전체를 분석한 후 분석농도와 첨가농도를 비교한 값을 퍼센트(%)로 나타낸다. 회수율 시험의 첨가농도는 2가지 수준으로 하는데 하나는 정량한계 농도로, 나머지 하나는 시료에서 잔류가 예상되는 농도 또는 정량한계의 10배 농도로 하고 3반복 수행한다.

12-1-18-4-5-3-6. 첨가농도 별 평균회수율의 허용범위는 아래 표와 같다. 분석이 까다로운 시료이거나 매우 낮은 농도에서 분석하기 어려운 성분의 경우 회수율이 기존범위를 벗어나도 허용할 수 있다.

농도범위(mg/kg)	재현성(RSD)	평균회수율(%)
≤ 0.001	35	50~120
> 0.001 ≤ 0.01	30	60~120
> 0.01 ≤ 0.1	25	70~120
> 0.1 ≤ 1.0	15	70~110
> 1.0	10	70~110

12-1-18-4-5-4. 노출량 계산

12-1-18-4-5-4-1. 조제시 노출량은 부위별 노출량의 합으로 아래와 같이 산출한다.

12-1-18-4-5-4-1-1. 고상품목

$$\text{손 노출량}(\mu\text{g}) = \text{손(세척액) 분석량}(\mu\text{g}/\text{mL}) \times \text{사용용매량}(\text{mL})$$

$$\text{머리 노출량}(\mu\text{g}) = \text{머리(거즈) 분석량}(\mu\text{g}/\text{mL}) \times \text{사용용매량}(\text{mL})$$

12-1-18-4-5-4-1-2. 액상품목

$$\text{노출량}(\mu\text{g}) = \text{손(세척액) 분석량}(\mu\text{g}/\text{mL}) \times \text{사용용매량}(\text{mL})$$

12-1-18-5. 2단계: 야외 포장조건에서의 살포농약 살포시 피부노출량산정(전신복장분석법) <개정 2026. 5. 6.>

12-1-18-5-1. 시험목적: 농약을 살포할 때 농약살포자에게 노출되는 농약의 양을 측정하는 것을 목적으로 한다.

12-1-18-5-2. 시험농약: 품목

12-1-18-5-3. 시험시기: 실험하고자 하는 농약을 사용하기 시기

12-1-18-5-4. 노출량 측정: 작업복(위,아래) 또는 보호복(위,아래), 내복(위,아래), 얼굴, 손, 보호장갑

12-1-18-5-5. 시험방법

12-1-18-5-5-1. 농약살포

- 12-1-18-5-5-1-1. 살포방법: 해당 작물에 대상 농약을 처리하는 관행적인 방법에 따르며 3반복으로 수행한다. 이 경우 스피드스프레이어는 1000리터 이상 1회 또는 500리터 이상 2회 살포를 1반복으로 본다. 동력분무기의 경우에는 과수와 채소의 경우 250리터 이상 2회 살포, 기타 작물인 경우에는 120 리터 이상 2회 살포를 1반복으로 본다.
- 12-1-18-5-5-1-2. 살포농도: 적용대상 병해충의 방제를 위해 농약관리법 시행령 제19조(농약등의 안전사용기준)에 따라 정해진 사용량에 적합하게 처리한다.
- 12-1-18-5-5-1-3. 살포복장: 내복, 작업복 또는 보호복, 앞챙이 있는 모자, 장갑을 착용한다.
- 12-1-18-5-5-1-3-1. 내복: 면 100% 재질을 사용한다.
- 12-1-18-5-5-1-3-2. 작업복: 폴리에스테르 65%, 면 35% 재질의 사용한다.
- 12-1-18-5-5-1-3-3. 보호복: 산업안전보건공단(KOSHA)의 인증을 받은 5-6형식의 전신보호복을 사용한다.
- 12-1-18-5-5-1-3-4. 작업자의 신체에 적합한 작업복 및 보호복을 선택하여 착용한다.
- 12-1-18-5-5-1-3-5. 손(장갑): 장갑은 시험 종료까지 본래의 상태를 유지할 수 있고 화학물질에 저항성을 갖는 나이트릴 재질의 장갑을 사용한다.
- 12-1-18-5-5-2. 농약추출
- 12-1-18-5-5-2-1. 세척액: 계면활성제 수용액(예;0.01% 에어로졸 OT-75 수용액) 또는 아이소프로판올 및 에탄올 중 순도가 높은 것을 사용하며, 수용성 농약인 경우에는 증류수를 사용한다.
- 12-1-18-5-5-2-2. 장갑: 장갑은 시험이 끝난 직후 세척액으로 장갑 표면을 2분 이상 충분히 세척한 후 세척액을 시료보관 용기에 담아 즉시 실험실로 운반한다. 이 후 필요시 적절한 양의 유기용매로 분배한 다음 농축 후 분석한다. 장갑 세척액의 용량은 1회 500 mL로 하고 2회 수행한다.
- 12-1-18-5-5-2-3. 손: 손이 장갑표면에 묻지 않게 장갑을 뒤집어 벗은 후, 손을 세척액으로 2분 이상 충분히 세척한 후 세척액을 시료보관 용기에 담아 즉시 실험실로 운반한다. 이 후 필요시 적절한 양의 유기용매로 분배한 다음 농축 후 분석한다. 손 세척액의 용량은 1회 500 mL로 하고 2회 수행한다.
- 12-1-18-5-5-2-4. 머리(얼굴/목): 머리의 농약 노출 측정을 위해 거즈(10x10 cm, 두께 1-2 mm) 2장을 겹쳐 사용한다. 세척액 4 mL로 적신 거즈를 이용하여 살포자의 얼굴과 목을 충분히 1회 닦고, 거즈를 시료보관 용기에 담아 즉시 실험실로 운반한다. 이 후 필요시 적절한 양의 유기용매로 추출한 다음 농축 후 분석한다.
- 12-1-18-5-5-2-5. 작업복(보호복) 및 내복: 시험 직후 작업복(보호복)과 내복은 상·하의로 구분하여 상호오염이나 접촉에 따른 손실이 없도록 주의하여 벗는

다. 이후 시료보관 용기에 담아 즉시 실험실로 운반한 다음 적절한 양의 세척액과 유기용매를 사용하여 농약을 추출한 다음 분석한다.

12-1-18-5-5-2-6. 모든 시료는 포장시험 종료 후 24시간 이내에 분석해야 한다. 24시간 이내에 분석이 완료되지 않을 경우 저장안정성을 시험을 통해 농약의 안정성을 확인하여야 한다. 단, 시험농약에 안정성이 이미 검증된 경우, 이전 시험의 결과값을 적용 할 수 있다.

12-1-18-5-5-3. 시험법

12-1-18-5-5-3-1. 저장안정성 시험: 저장기간 동안 농약의 안정성을 검증하기 위해 사용하지 않은 노출측정용 시료(거즈, 세척액, 내복, 작업복)에 표준용액을 첨가하고 노출시험 후 수거한 시료와 동일한 방법과 조건으로 저장한 다음 기기분석 후 분석농도와 첨가농도를 비교한 값을 회수율 퍼센트(%)로 나타낸다. 첨가농도는 정량한계 농도 10배 농도로 하고 3반복 수행한다.

12-1-18-5-5-3-2. 검출한계 시험: 시료 중 분석물질의 검출할 수 있는 가장 낮은 농도로 정량한 값의 정확성을 보장할 수는 없으나 시료 중 분석물질의 존재 가능성을 측정할 수 있는 최소한의 농도를 뜻한다. 검출한계는 무처리 시료에 표준품을 처리하여 분석한 크로마토그램 상 시그널노이즈비가 3-5배인 값으로 한다.

12-1-18-5-5-3-3. 재현성 시험: 분석기기의 안정성 검증을 위해 표준용액의 크로마토그램 면적의 평균값을 비교하여 나타낸다. 분석농도는 정량한계 및 정량한계 2-10배 수준의 2개 농도로 하고 3반복 수행한다.

12-1-18-5-5-3-4. 회수율 시험: 분석방법의 검증을 위해 사용하지 않은 노출측정용 시료(거즈, 세척액, 내복, 외복)에 표준용액을 첨가하고 시료 전체를 분석한 후 분석농도와 첨가농도를 비교한 값을 퍼센트(%)로 나타낸다. 회수율 시험의 첨가농도는 2가지 수준으로 하는데 하나는 정량한계 농도로, 나머지 하나는 시료에서 잔류가 예상되는 농도 또는 정량한계의 10배 농도로 하고 3반복 수행한다.

12-1-18-5-5-3-5. 첨가농도 별 평균회수율의 허용범위는 아래 표와 같다. 분석이 까다로운 시료이거나 매우 낮은 농도에서 분석하기 어려운 성분의 경우 회수율이 기존범위를 벗어나도 허용할 수 있다.

농도범위(mg/kg)	재현성(RSD)	평균회수율(%)
≤ 0.001	35	50~120
> 0.001 ≤ 0.01	30	60~120
> 0.01 ≤ 0.1	25	70~120
> 0.1 ≤ 1.0	15	70~110
> 1.0	10	70~110

12-1-18-5-5-4. 노출량 계산

12-1-18-5-5-4-1. 살포시 피부노출량은 부위별 노출량의 합으로 다음과 같이

산출한다.

손 노출량( $\mu\text{g}$ ) = 손(세척액) 분석량( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) x 사용 용매량( $\text{mL}$ )

머리 노출량( $\mu\text{g}$ ) = 머리(거즈) 분석량( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) x 사용 용매량( $\text{mL}$ )

내복 노출량( $\mu\text{g}$ ) = 내복 분석량( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) x 사용 용매량( $\text{mL}$ )

12-1-18-6. 2단계: 야외 포장조건에서의 살포농약 조제 및 살포시 흡입노출량산정(IOM 채집기법, 흡착제튜브법) <개정 2026.00.00.>

12-1-18-6-1. 시험목적: 살포농약을 조제하고 살포할 때 농약살포자의 호흡에 의해 노출되는 농약량을 측정하는 것을 목적으로 한다.

12-1-18-6-2. 시험농약: 품목

12-1-18-6-3. 시험시기: 실험하고자 하는 농약을 사용하기 시기

12-1-18-6-4. 흡착기구: Personal Air Monitor(PAM)

12-1-18-6-4-1. PAM: 농약의 흡입노출량을 측정하기 위한 기구이며, 펌프와 IOM 채집기 및 유리섬유필터로 구성된다.

12-1-18-6-4-2. 펌프: 건전지와 다이어프램펌프(diaphragm pump)로 구성되며, 최대 유량이 2.5-3.0 L/min의 것이 적당하다. 유량은 1.0-2.0 L/min으로 사용하는데 설정유량의  $\pm 10\%$  이내에서 작동되어야 한다.

12-1-18-6-4-3. IOM 채집기법: IOM 채집기와 유리섬유필터를 이용하여 실험을 수행한다.

12-1-18-6-4-4. 흡착제튜브법: 흡착제는 포집대상 농약의 물리화학적 특성에 따라 적절한 흡착제를 선택하여 실험을 수행하며, 흡착제에는 유리섬유, Chromsorb, Tenax, silica, alumina, activated charcoal, florisil 등이 있다

12-1-18-6-4-5. PAM 부착: 작업자 허리에 펌프를 고정하고, IOM 채집기 또는 흡착제관이 집계를 이용하여 시험자의 입 주위에 위치하도록 고정한다. 농작업 중 펌프와 채집기가 탈착되지 않도록 주의하여야 한다.

12-1-18-6-5. 시험방법

12-1-18-6-5-1. 살포농약 조제 및 살포: 야외포장조건에서의 살포농약 조제 및 살포시 시험방법에 준한다.

12-1-18-6-5-2. PAM: 시험 실시 이전에 설정유량을 확인한 다음 시험을 수행하여야 한다. 펌프는 시험을 시작할 때 시험자가 작동시키고, 시험이 종료한 직후 펌프를 꺼야한다.

12-1-18-6-5-3. 농약추출: 채집기 내부의 유리섬유필터 또는 고체흡착제를 교차 오염되지 않게 분리한 다음 용기에 담아 즉시 실험실로 운반한다. 이 후 적절한 양의 유기용매로 추출한 후 분석한다.

12-1-18-6-5-4. 포장시험종료 후 24시간 이내에 분석해야 한다. 24시간 이내에

분석이 완료되지 않을 경우 저장안정성 시험을 통해 농약의 안정성을 확인하여야 한다. 단, 시험농약에 안정성이 이미 검증된 경우, 이전 시험의 결과값을 적용 할 수 있다.

#### 12-1-18-6-6. 시험법

12-1-18-6-6-1. 저장안정성 시험: 저장기간 동안 농약의 안정성을 검증하기 위해 사용하지 않은 유리섬유필터 또는 흡착제에 표준용액을 첨가하고 노출시험 후 수거한 시료와 동일한 방법과 조건으로 저장한 다음 기기분석 후 분석농도와 첨가농도를 비교한 값을 회수율 퍼센트(%)로 나타낸다. 첨가농도는 정량한계 농도 10배 농도로 하고 3반복 수행한다.

12-1-18-6-6-2. 검출한계 시험: 시료 중 분석물질을 검출할 수 있는 가장 낮은 농도로 정량한 값의 정확성을 보장할 수는 없으나 시료 중 분석물질의 존재 가능성을 측정할 수 있는 최소한의 농도를 뜻한다. 검출한계는 무처리 시료에 표준품을 처리하여 분석한 크로마토그램 상 시그널노이즈비가 3-5배인 값으로 한다.

12-1-18-6-6-3. 재현성 시험: 분석기기의 안정성 검증을 위해 표준용액의 크로마토그램 면적의 평균값을 비교하여 나타낸다. 분석농도는 정량한계 및 정량한계 2-10배 수준의 2개 농도로 하고 3반복 수행한다.

12-1-18-6-6-4. 회수율 시험: 시료의 전처리 방법의 검증을 위해 사용하지 않은 노출측정용 유리섬유필터 또는 흡착제에 표준용액을 첨가하고 시료 전체를 분석한 후 분석농도와 첨가농도를 비교한 값을 퍼센트(%)로 나타낸다. 회수율 시험의 첨가농도는 2가지 수준으로 하는데 하나는 정량한계 농도로, 나머지 하나는 시료에서 잔류가 예상되는 농도 또는 정량한계의 10배 농도로 하고 3반복 수행한다.

#### 12-1-18-6-6-5. 포집지속 시험(과과 시험)

12-1-18-6-6-5-1. IOM 채집법: 유리섬유필터 또는포집된 농약이 시료채취 기간 중 손실되지 않음을 확인하는 시험이다. 유리섬유필터 또는 농약을 10 LOQ의 농도로 처리하고 IOM 채집기에 장착한 후, 펌프와 IOM 채집기 사이에 흡착관(XAD-2 resin)을 연결하여 노출시험과 같은 유량으로 공기를 통과시켜 흡착관으로 흡착된 농약을 측정한다. 흡착관 내 흡착제는 대상농약의 물리화학적 특성에 따라 XAD, Chromsorb, Tenax, silica, alumina, activated charcoal, florasil 등을 사용할 수 있다. 흡착관의 후반부위로 흡착된 농약의 양이 처리량의 20% 이내가 되어야 하며, 펌프의 유량은 시험초기에 보정기를 사용하여 필요한 유량으로 보정해야 한다.

12-1-18-6-6-5-2. 흡착제투브법: 고체흡착제에 포집된 농약이 시료채취 기간 중 손실되지 않음을 확인하는 시험이다. 흡착관의 전반부위에 농약을 10 LOQ의 농도로 처리하고 펌프에 연결하여 노출시험과 같은 유량으로 공기를 통과시켜

흡착관의 후반부위로 흡착된 농약을 측정한다. 흡착관 내 흡착제는 대상농약의 물리화학적인 특성에 따라 XAD, Chromsorb, Tenax, silica, alumina, activated charcoal, florisil 등을 사용할 수 있다. 흡착관의 후반부위로 흡착된 농약의 양이 처리량의 20% 이내가 되어야 하며, 펌프의 유량은 시험초기에 보정기를 사용하여 필요한 유량으로 보정해야 한다

12-1-18-6-6-6. 포집효율 시험: 실제 공기 중 휘발된 농약에 대한 흡착제의 포집효율(trapping efficiency)을 측정하는 실험이다. U자형 유리관 안에 10 LOQ 수준으로 농약을 녹인 용매를 소량 넣고 펌프에 연결하여 노출시험과 같은 유량으로 공기를 통과시켜 유리섬유필터에 흡착된 농약과 유리관에 잔존하는 농약의 양을 비교한다. 휘발성이 극히 낮은 농약은 유리관 바닥에 약한 열(60-70°C)을 가하여 휘발을 도울 수 있다. 펌프의 유량은 시험초기에 보정기를 사용하여 필요한 유량으로 보정해야 한다.

12-1-18-6-6-7. 첨가농도 별 평균회수율의 허용범위는 아래 표와 같다. 분석이 까다로운 시료이거나 매우 낮은 농도에서 분석하기 어려운 성분의 경우 회수율이 기존범위를 벗어나도 허용할 수 있다.

농도범위(mg/kg)	재현성(RSD)	평균회수율(%)
≤ 0.001	35	50-120
> 0.001 ≤ 0.01	30	60-120
> 0.01 ≤ 0.1	25	70-120
> 0.1 ≤ 1.0	15	70-110
> 1.0	10	70-110

12-1-18-6-7. 노출량 계산

12-1-18-6-7-1. 호흡 노출량은 다음과 같이 산출한다

$$\text{호흡노출량(ng)} = \frac{\text{분석량(ng)}}{\text{Airpump 유속(L/hr)}} \times \text{호흡속도(L/hr)}$$

12-1-18-6-7-2. 호흡을 통한 농약노출량의 계산에는 다음 표의 호흡량을 적용하여야 한다.

남자의 호흡량	여자의 호흡량
1,270 L/hr	930 L/hr

12-1-18-6-8. 결과보고서 작성

12-1-18-6-8-1. 결과보고서는 살포농약 조제자 및 살포자의 피부노출량과 흡입 노출량 측정시험에 대한 시험정보와 결과 등을 모두 확인 할 수 있게 작성되어야 하고, 아래와 같은 사항을 반드시 포함해야 한다.

12-1-18-6-8-1-1. 일반사항: 시험번호, 시험제목, 시험일정, 시험의뢰자, 시험기관, 시험목적, 사용시험법, 시험물질의 보관, 시험자료의 보관, 시험관계자

12-1-18-6-8-1-2. 제출문: 시험제목, 시험물질, 시험의뢰자, 시험방법, 시험책임

자 서명

12-1-18-6-8-1-3. 시험 보고서: 시험 결과의 요약, 시험내용의 요약, 재료 및 방법(재료, 시험물질, 포장 및 기후조건, 노출시험, 분석법, 저장안정성, 시료분석, 통계처리), 결과 및 고찰

12-1-18-6-8-2. 별첨: 피부 및 호흡노출량 산출 기록지, 시험포장의 위치, 시험 수행 사진(시험자, 작물, 적용기기, 조제 및 살포 모습 등), 검량선, 크로마토그램 등

### **12-1-19. 급성경구독성시험: 고정용량법 <12·02·07 신설>**

12-1-19-1. 시험농약: 원제 및 품목

12-1-19-2. 시험동물

12-1-19-2-1. 시험동물 및 계통: 선호하는 설치류는 랫드이나 다른 종의 설치류도 사용할 수 있다.

12-1-19-2-2. 연령: 건강하고 성숙된 동물로서 임신 및 출산경험이 없는 개체를 선발하되, 투여를 시작할 때 8주-12주가 되어야 하고 평균체중의  $\pm 20\%$  범위 내에서 균일한 개체를 시험한다.

12-1-19-2-3. 성별: 주로 암컷을 사용하며, 구조적으로 유사한 화학물질의 독성학적 또는 독성동태학적 특성이 수컷에서 더 민감하다고 알려져 있는 경우에는 수컷을 사용한다. 수컷으로 수행한 경우에는 이에 대한 합당한 근거를 제시해야 한다.

12-1-19-2-4. 시험동물수: 각 시험약량 수준 당 한 쪽 성으로 된 총 다섯 마리의 동물을 사용한다. 예비 시험 시 선택된 약량 수준에서 시험한 동물 한 마리와 추가적인 네 마리의 동물로 이루어진다.

12-1-19-3. 시험약량 수준설정 및 약제의 조제

12-1-19-3-1. 시험약량 수준

12-1-19-3-1-1. 기초시험: 한 쪽 성의 동물 그룹에 단계적으로 5, 50, 300, 2,000 mg/kg의 고정 약량을 투여한다. 특별한 구제 상의 필요가 있을 때에만 예외적으로 5,000mg/kg 약량의 사용을 고려 할 수 있다. 심각한 독성 효과나 치사를 일으키지 않는 독성의 징후를 보일 것으로 예상되는 약량을 사용한 예비시험을 기초로 하여 시작 약량 수준을 선택한다.

12-1-19-3-1-2. 예비 및 본 시험: 예비 시작 약량은 동일한 화학물질이나 구조적으로 유사한 화학물질의 체내·체외 데이터에 근거하여 예상되는 약량으로

5, 50, 300, 2,000mg/kg의 고정 약량 수준에서 선택한다. 예비 시험 시 최저 약량수준 (5mg/kg) 에서 실험동물 한 마리가 치사한 경우에는 보통은 예비 시험을 종료시키고 해당 물질을 GHS Category 1로 분류한다. 그러나 이러한 분류에 추가적인 확인이 필요한 경우에는 보충 시험을 선택적으로 수행할 수 있다.

12-1-19-3-1-3. 한계시험: 시험물질이 비독성일 것을 알려주는 정보를 가지고 있는 경우에 예비적으로 수행한다. 2,000mg/kg의 약량에서 시작하여 이 수준에서 이후에 네 마리의 동물에 투여하는 시험이다.

12-1-19-3-2. 용매의 선택: 시험농약을 그대로 투여하든가 그렇지 않을 경우 적당한 용매에 용해 또는 현탁시켜 투여한다. 이때 사용되는 용매나 현탁제는 가능한 경우 수용액/현탁액/유제의 사용을 권장하며 순서대로 수용액/현탁액/오일에 녹인 유제가 더 좋고 다른 용매에 녹인 용액을 쓸 수도 있다. 물 이외의 다른 용매의 경우에는 독성학적 특성이 알려져 있는 것이어야 한다.

12-1-19-3-3. 투여액량: 시험 할 약량범위에 걸쳐 투여 약량의 농도를 달리하여 일정한 부피로 시험 물질을 투여해야 한다. 그러나 액체의 완제품이나 혼합물을 시험하는 경우에는 희석하지 않은 시험물질의 사용이 위해성 평가에 더 관련이 있을 수 있을 경우 희석하지 않고 투여한다. 그러나 두 가지 경우 모두 투여하는 최대 약량부피를 초과하면 안 된다. 한 번에 투여할 수 있는 액체의 최대 부피는 실험동물의 크기에 따라 달라진다. 설치류에서는 보통 부피가 체중 100g당 1ml을 초과해서는 안 된다. 그러나 수용액의 경우에는 체중 100g당 2ml도 고려해볼 수 있다.

12-1-19-4. 투여방법

12-1-19-4-1. 시험농약은 적절한 삽입관을 사용하여 1회 위내에 강제 경구투여하며, 한 번에 투여가 불가능한 특수한 경우 24시간이내에 여러 번 1회 분량으로 투여할 수 있다.

12-1-19-4-2. 투여 전에 실험동물은 금식시켜야 한다. 랫드의 경우 물을 제외한 먹이는 하룻밤 주지 않아야하고, 마우스의 경우 물을 제외한 먹이를 3-4시간 주지 않아야 한다.

12-1-19-4-3. 금식 후 실험동물의 무게를 재고 그 무게에 따라 약량을 산출해 시험물질을 투여한다.

12-1-19-4-4. 시험물질 투여한 후에 랫드는 3-4시간, 마우스는 1-2시간 후 까지 금식시킨다.

12-1-19-5. 관찰기간: 투여 후 처음 30분 동안 최소한 한번은 실험동물을 개별적으로 관찰하고, 처음24시간 동안 치사한 경우를 제외하고는 총 14일 동안 동물을 관찰한다. 독성 반응, 발병시간, 회복기간에 따라 필요한 경우 더 연장될 수 있다.

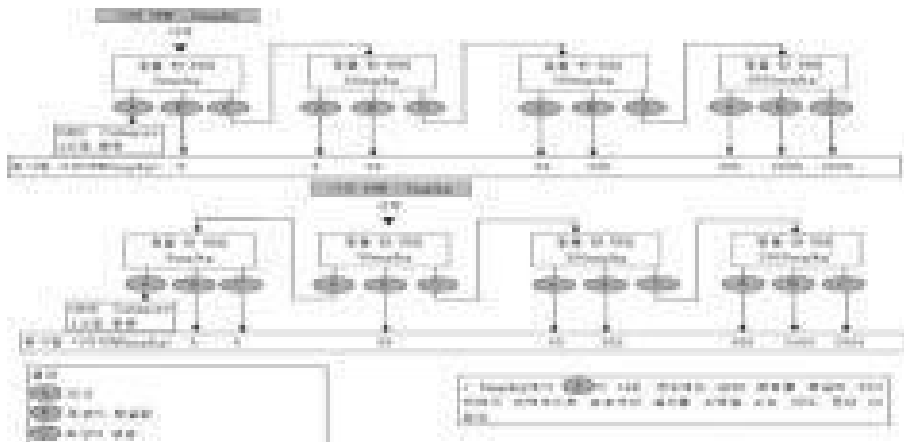
12-1-19-6. 관찰항목

12-1-19-6-1. 임상관찰: 육안으로 관찰되는 독성징후의 종류, 회복시기 및 치사시기 등 모든 관찰사항을 체계적으로 기록한다.

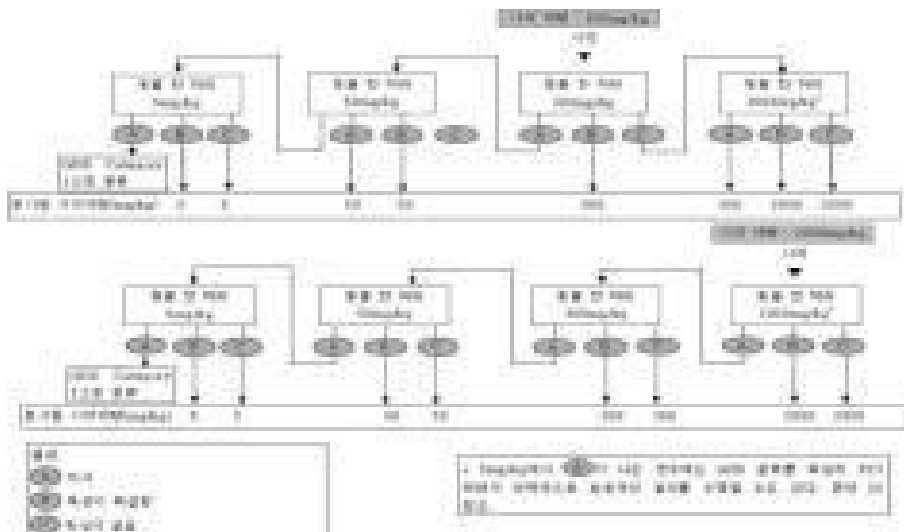
12-1-19-6-2. 체중측정: 시험물질을 투여하기 직전에 각 동물의 체중을 재고 그 후로 최소한 일주일에 한 번씩은 측정해야 한다. 시험의 종료 시 생존한 동물의 체중을 재 후 인도적으로 안락사 시킨다.

12-1-19-6-3. 부검소견: 실험동물은 모두 부검해야 하며, 각 동물의 모든 병리적 변화를 기록해야 한다.

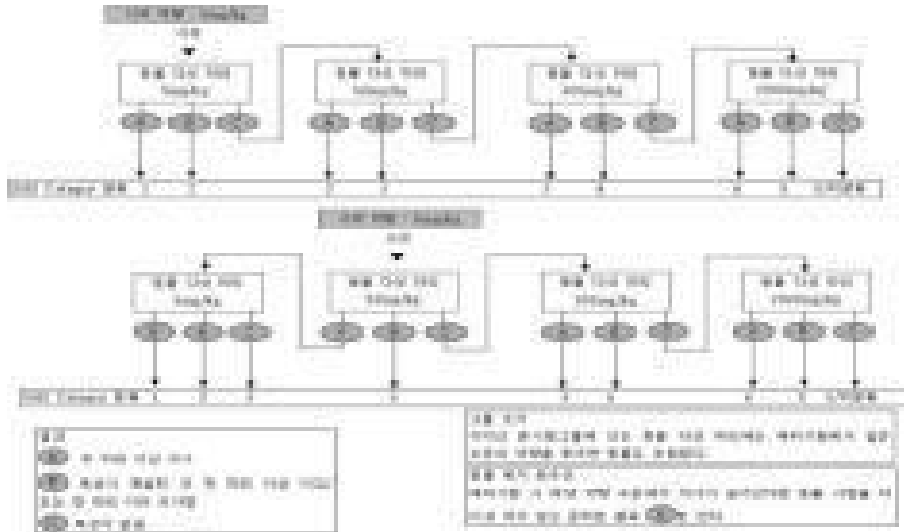
<예비시험 시작약량 5mg/kg 순서도>



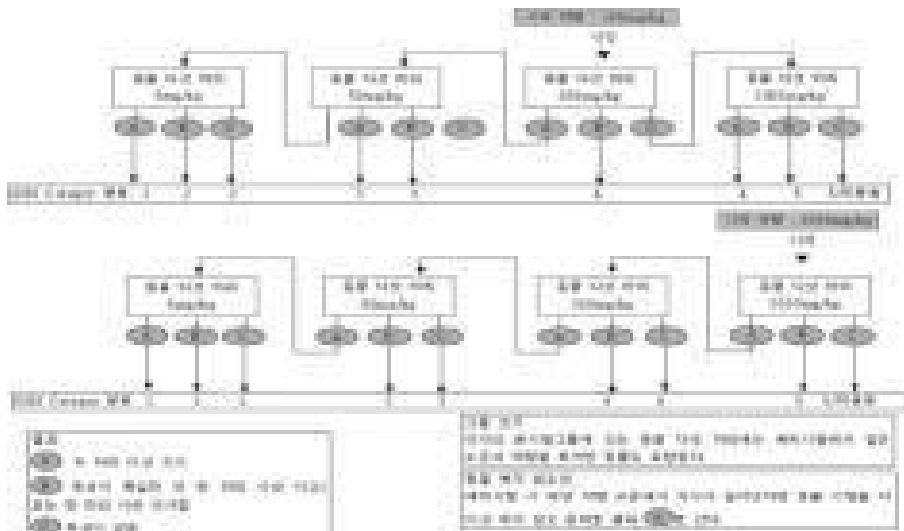
<예비시험 시작약량 200mg/kg 순서도>



<본시험시작약량 5mg/kg순서도>



<본시험 시작약량 300 mg/kg 순서도>



**12-1-20. 급성경구독성시험: 급성독성등급법 <12·02·07 신설>**

12-1-20-1. 시험농약: 원제 및 품목

12-1-20-2. 시험동물

12-1-20-2-1. 시험동물 및 계통: 선호하는 설치류는 랫드이나 다른 종의 설치류도 사용할 수 있다.

12-1-20-2-2. 연령: 건강하고 성숙된 동물로서 임신 및 출산경험이 없는 개체를 선발하되, 투여를 시작할 때 8주-12주가 되어야 하고 평균체중의 ±20% 범위 내에서 균일한 개체를 시험한다.

12-1-20-2-3. 성별: 주로 암컷을 사용하며, 구조적으로 유사한 화학물질의 독성학적 또는 독성동태학적 특성이 수컷에서 더 민감하다고 알려져 있는 경우에는 수컷을 사용한다. 수컷으로 수행한 경우에는 이에 대한 합당한 근거를 제

시해야 한다.

12-1-20-2-4. 시험동물수: 각 단계마다 총 세 마리의 동물을 사용한다. 최소 여섯 마리를 사용한다.

12-1-20-3. 시험약량 수준설정 및 약제의 조제

12-1-20-3-1. 시험약량 수준

12-1-20-3-1-1. 본 시험: 단계별로 1단계에서 5, 50, 300, 2,000mg/kg 중 치사할 확률이 가장 높은 것을 선택해서 투여한다. 투여 결과에 따라 2단계에서 1단계의 동일약량이나 그보다 낮은 약량을 투여한다. 시험물질에 대한 정보가 없는 경우에는 300mg/kg을 시작 약량으로 할 것을 권장한다. 특별한 규제 상의 필요가 있을 때에만 예외적으로 5,000mg/kg 약량의 상용을 고려할 수 있다.

12-1-20-3-1-2. 한계시험: 시험물질이 비독성일 것을 알려주는 정보를 가지고 있는 경우에 예비적으로 수행한다. (최고수준의 시작약량 (2,000mg/kg)에서도 치사하지 않을 것이라는 자료가 있을 때에는 한계시험을 수행한다.) 2,000mg/kg 약량수준의 한계시험에서는 여섯 마리의 동물을 사용한다. 예외적으로 5,000mg/kg의 약량에서 세 마리의 동물을 사용하여 한계시험을 할 수도 있다.

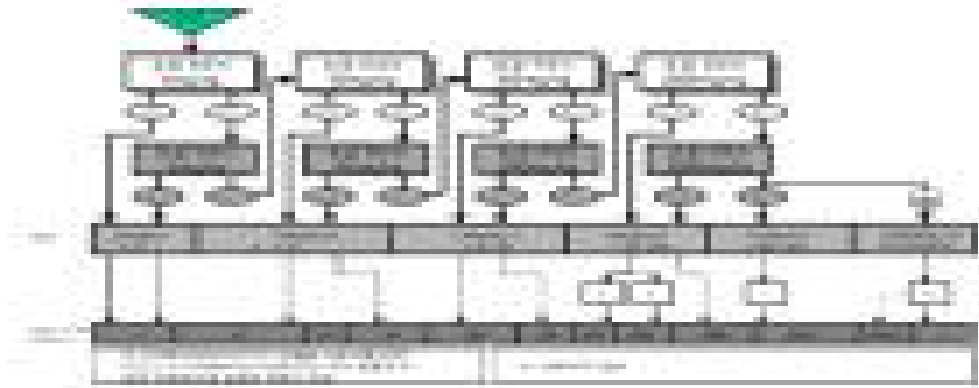
12-1-20-3-2. 용매의 선택: 시험농약을 그대로 투여하든가 그렇지 않을 경우 적당한 용매에 용해 또는 현탁시켜 투여한다. 이때 사용되는 용매나 현탁제는 가능한 경우 수용액/현탁액/유제의 사용을 권장하며 순서대로 수용액/현탁액/오일에 녹인 유제가 더 좋고 다른 용매에 녹인 용액을 쓸 수도 있다. 물 이외의 다른 용매의 경우에는 독성학적 특성이 알려져 있는 것이어야 한다.

12-1-20-3-3. 투여액량: 시험 할 약량범위에 걸쳐 투여 약량의 농도를 달리하여 일정한 부피로 시험 물질을 투여해야 한다. 그러나 액체의 완제품이나 혼합물을 시험하는 경우에는 희석하지 않은 시험물질의 사용이 위해성 평가에 더 관련이 있을 수 있을 경우 희석하지 않고 투여한다. 그러나 두 가지 경우 모두 투여하는 최대 약량부피를 초과하면 안 된다. 한 번에 투여할 수 있는 액체의 최대 부피는 실험동물의 크기에 따라 달라진다. 설치류에서는 보통 부피가 체중 100g당 1ml을 초과해서는 안 된다. 그러나 수용액의 경우에는 체중 100g당 2ml도 고려해볼 수 있다.

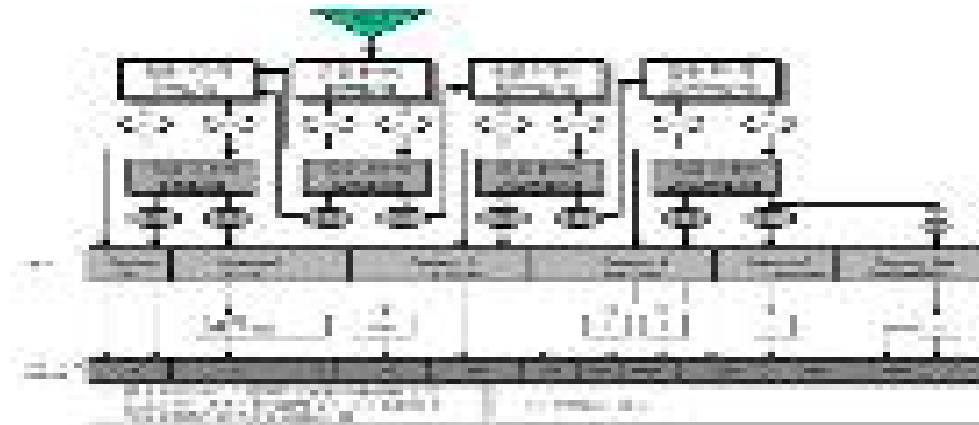
12-1-20-4. 투여방법

- 12-1-20-4-1. 시험농약은 적절한 삼입관을 사용하여 1회 위내에 강제 경구투여 하며, 한 번에 투여가 불가능한 특수한 경우 24시간이내에 여러 번 1회 분량으로 투여할 수 있다.
- 12-1-20-4-2. 투여 전에 실험동물은 금식시켜야 한다. 랫드의 경우 물을 제외한 먹이는 하룻밤 주지 않아야하고, 마우스의 경우 물을 제외한 먹이를 3-4시간 주지 않아야 한다.
- 12-1-20-4-3. 금식 후 실험동물의 무게를 재고 그 무게에 따라 약량을 산출해 시험물질을 투여한다.
- 12-1-20-4-4. 시험물질 투여한 후에 랫드는 3-4시간, 마우스는 1-2시간 후 까지 금식시킨다.
- 12-1-20-5. 관찰기간: 투여 후 처음 30분 동안 최소한 한번은 실험동물을 개별적으로 관찰하고, 처음24시간 동안 치사한 경우를 제외하고는 총 14일 동안 동물을 관찰한다. 독성 반응, 발병시간, 회복기간에 따라 필요한 경우 더 연장될 수 있다.
- 12-1-20-6. 관찰항목
- 12-1-20-6-1. 임상관찰: 육안으로 관찰되는 독성징후의 종류, 회복시기 및 치사시기 등 모든 관찰사항을 체계적으로 기록한다.
- 12-1-20-6-2. 체중측정: 시험물질을 투여하기 직전에 각 동물의 체중을 재고 그 후로 최소한 일주일에 한 번씩은 측정해야 한다. 시험의 종료 시 생존한 동물의 체중을 재 후 인도적으로 안락사 시킨다.
- 12-1-20-6-3. 부검소견: 실험동물은 모두 부검해야하며, 각 동물의 모든 병리적 변화를 기록해야 한다.
- 12-1-20-7. 반수치사약량(LD50) 산출: 시험 종료 후 아래 순서도에 따라 반수치사약량(LD50)를 산출한다. <개정 2018.12.17.>

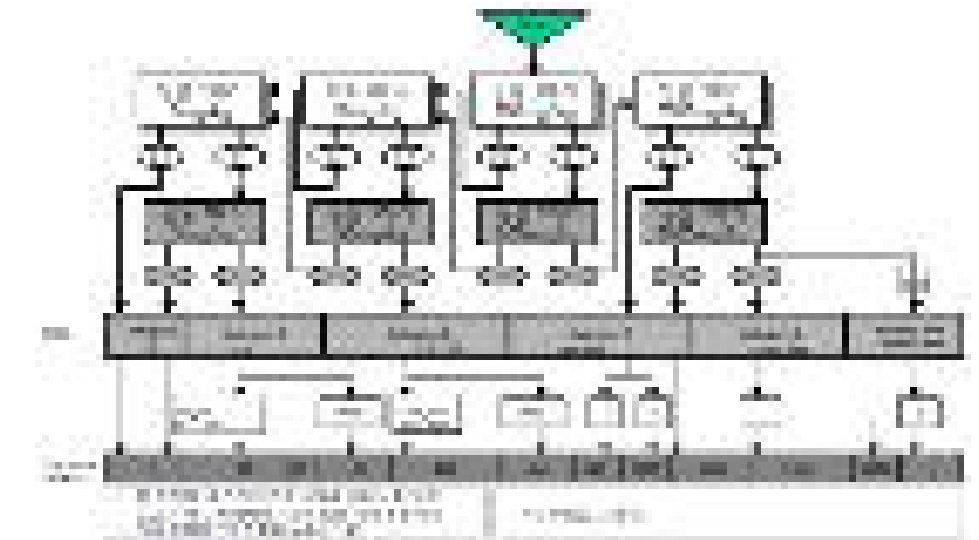
<시작약량 5 mg/kg 순서도>



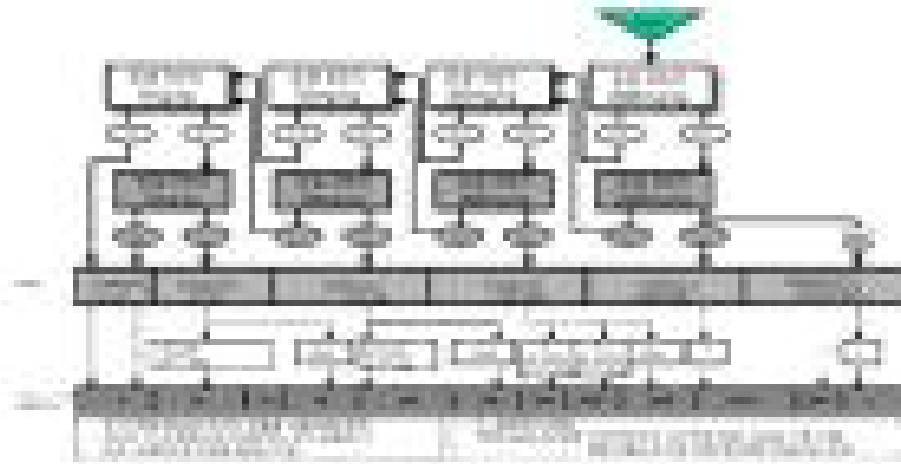
<시작약량 50 mg/kg 순서도>



<시작약량 300 mg/kg 순서도>



<시작약량 2000 mg/kg 순서도>



## 12-1-21. 피부감작성시험 : 국소림프절시험법(Local Lymph node Assay)

### <12·02·07 신설>

12-1-21-1. 시험농약: 원제 및 품목

12-1-21-2. 시험동물

12-1-21-2-1. 시험동물 및 계통: CBA/J 계통의 마우스가 선호되며, 종 특이성이 없다는 것을 증명하는 데이터가 있을 때 다른 종이 사용될 수 있다.

12-1-21-2-2. 연령: 건강하고 성숙된 동물로서 임신 및 출산경험이 없는 개체를 선발하되, 투여를 시작할 때 8주-12주령 사이의 평균체중 20%를 초과하지 않는 범위 내에서 균일한 개체를 선발한다.

12-1-21-2-3. 성별: 암컷을 사용 하는 것을 원칙으로, 성별 차이가 없다는 것을 증명하는 데이터가 있을 때는 수컷이 사용될 수 있다.

12-1-21-2-4. 시험동물 수: 처리그룹 당 최소 4마리 동물을 사용하며, 물질처리 는 최소 3개 이상의 농도로 처리하여야 한다.

12-1-21-3. 처리농도 수준 설정

12-1-21-3-1. 투여용액: 고체의 시험물질인 경우 마우스 귀에 적용하기 전 적절한 용매에 녹이거나 희석하여 사용할 수 있다. 액체의 시험물질의 경우 희석 시키거나 원제 그대로를 사용할 수 있다.

12-1-21-3-2. 투여농도설정: 0.5%, 1%, 2.5%, 5%, 10%, 25%, 50%, 100% 등과 같은 적절한 연속적 농도로 처리를 하며, 테스트 물질(흥미롭고, 구조적인 연관이 있는 물질)의 독성학적 정보, 구조 및 물리화학적인 정보가 존재하는 경우에는 전신독성 및 국부적 피부자극성을 피하는 범위에서 최고농도의 연이은 3 농도를 선택한다. 독성학적 정보가 없을 경우에는 예비실험을 필요로 한다.

12-1-21-3-3. 예비실험: 예비실험은 최고투여량의 정보가 없을 경우 적절한 투여량을 정하기 위해 수행된다. 예비실험에서 사용되는 테스트 물질은 액체 또는 고체, 현탁액의 최대 농도가 100%가 되어야 한다. 시험 동물 수는 투여 그룹 당 한 마리 또는 두 마리가 추천된다. 나머지 조건은 본 실험과 동일한 조건하에서 수행된다.

#### 12-1-21-3-4. 대조군 설정

12-1-21-3-4-1. 양성대조군: 양성대조군을 사용해 분석이 적절하게 수행되었는지 확인해야 한다. 피부자극이나 전식독성을 과도하게 야기 시키지 않고 유도를 재현할 수 있고 과도하지 않은 물질 ( $3 < \text{자극지수(SI)} < 20$ ) 을 선택해야 한다. 선호되는 양성대조군 실험물질은 acetone : olive oil (4:1, v/v)에 25% hexyl cinnamic aldehyde (Chemical Abstracts Service[CAS] No 101-86-0) 또는 acetone : olive oil (4:1, v/v)에 25% eugenol (CAS No 97-53-0)이다. 충분한 근거가 있을 때, 위의 기준에 맞는 다른 양성대조군 시험물질이 사용 될 수 있다.

12-1-21-3-4-2. 용매대조군: 용매로 사용된 물질을 사용한다.

12-1-21-3-5. 용매의 선택: 용매의 경우 실험결과에 영향을 주지 않아야 하며, 추천되는 용매는 acetone : olive oil (4:1 v/v), *N, N*-dimethylformamide, methyl ethyl ketone, propylene glycol, dimethylsulphoxide 이며, 과학적으로 충분한 근거가 있다면 다른 것을 사용할 수 있다. 적절한 가용화제 (solubilisers - 1% Pluronic® L92)를 용매에 포함시켜 물질 처리 후 즉시 흘러내려가지 않게 한다.

#### 12-1-21-4. 처리방법

##### 12-1-21-4-1. 1일- 물질처리

12-1-21-4-1-1. 각 동물의 체중, 귀 두께 측정 및 임상증상을 개별적으로 확인하고 기록한다.

12-1-21-4-1-2. 용매대조군, 시험물질군, 양성대조군 물질 25ul를 양쪽 귓등에 각각 처리한다.

##### 12-1-21-4-2. 2, 3일- 물질처리

12-1-21-4-2-1. 1일째 처리와 동일한 절차로 반복한다.

##### 12-1-21-4-3. 4, 5일- 휴지기

12-1-21-4-3-1. 처리하지 않는다.

##### 12-1-21-4-4. 6일- 귀 두께 측정 및 림프절 분리

- 12-1-21-4-4-1. 각 동물의 체중을 측정한다.
- 12-1-21-4-4-2.  $^3\text{H}$ -methyl thymidine(20 uCi,  $7.4 \times 10^5$  Bq) 250ul를 마우스 미정맥에 투여한다. ( 대체 가능  $^{125}\text{I}$ -iododeoxyuridine,  $10^{-5}\text{M}$  fluorodeoxyuridine (2 uCi,  $7.4 \times 10^4$  Bq))
- 12-1-21-4-4-3. 투여 후 5시간 후 동물을 인도적으로 처리한다.
- 12-1-21-4-4-4. 양쪽 귀의 림프절을 분리하여 각각 phosphate buffered saline (PBS)로 나눈다.
- 12-1-21-5. 세포현탁액 준비 (Preparation of Cell suspensions)
- 12-1-21-5-1. 마우스의 이개 림프절(lymph node cell, LNC)을 분리하여 멸균된 스테인레스 200 micro mesh를 이용하여 단일세포를 분리한다.
- 12-1-21-5-2. 분리된 단일세포는 5% trichloroacetic acid (TCA)에 넣고 18시간 냉장 보관 후 scintillation cocktail 용액을 혼합한다.
- 12-1-21-6. 세포의 증식 측정 (Determination of cellular proliferation)
- 12-1-21-6-1. 신틸레이션 카운터 (Scintillation counter : $\beta$ ,  $\gamma$ 선)를 사용하여 DPM (disintegrations per minute)를 측정한다.
- 12-1-21-7. 관찰항목
- 12-1-21-7-1. 임상관찰: 물질처리 적용면의 국부 자극성이나 전신독성의 임상증상을 적어도 하루에 한번은 주의 깊게 관찰하고, 개별적으로 체계적으로 기록한다.
- 12-1-21-7-2. 체중측정: 시험물질을 투여하기 직전에 각 동물의 체중을 재고 부검 시 개별적인 동물 체중을 측정한다.

## **12-1-22. 피부감작성시험: 국소림프절시험법-DA(Local Lymph Node Assay-DA) <12·02·07 신설>**

- 12-1-22-1. 시험농약: 원제 및 품목
- 12-1-22-2. 시험동물
- 12-1-22-2-1. 시험동물 및 계통: CBA/J 계통의 마우스가 선호되며, 종 특이성이 없다는 것을 증명하는 데이터가 있을 때 다른 종이 사용될 수 있다.
- 12-1-22-2-2. 연령: 건강하고 성숙된 동물로서 임신 및 출산경험이 없는 개체를 선발하되, 투여를 시작할 때 8주-12주령 사이의 평균체중 20%를 초과하지 않는 범위 내에서 균일한 개체를 선발한다.
- 12-1-22-2-3. 성별: 암컷을 사용 하는 것을 원칙으로, 성별 차이가 없다는 것을

증명하는 데이터가 있을 때는 수컷이 사용될 수 있다.

12-1-22-2-4. 시험동물 수: 처리그룹 당 최소 4마리 동물을 사용하며, 물질처리 는 최소 3개 이상의 농도로 처리하여야 한다.

12-1-22-3. 처리농도 수준 설정

12-1-22-3-1. 투여용액: 고체의 시험물질인 경우 마우스 귀에 적용하기 전 적절한 용매에 녹이거나 희석하여 사용할 수 있다. 액체의 시험물질의 경우 희석 시키거나 원제 그대로를 사용할 수 있다.

12-1-22-3-2. 투여농도설정: 0.5%, 1%, 2.5%, 5%, 10%, 25%, 50%, 100% 등과 같은 적절한 연속적 농도로 처리를 하며, 테스트 물질(흥미롭고, 구조적인 연관이 있는 물질)의 독성학적 정보, 구조 및 물리화학적인 정보가 존재하는 경우에는 전신독성 및 국부적 피부자극성을 피하는 범위에서 최고농도의 연이은 3 농도를 선택한다. 독성학적 정보가 없을 경우에는 예비실험을 필요로 한다.

12-1-22-3-3. 예비실험: 예비실험은 최고투여량의 정보가 없을 경우 적절한 투여량을 정하기 위해 수행된다. 예비실험에서 사용되는 시험 물질은 액체는 최대 농도가 100%가 되어야하며, 고체 또는 현탁액은 적용가능한 최대 농도로 사용한다. 시험 동물 수는 투여 그룹 당 한 마리 또는 두 마리가 추천된다. 나머지 조건은 본 실험과 동일한 조건하에서 수행된다.

12-1-22-3-4. 대조군 설정

12-1-22-3-4-1. 양성대조군: 양성대조군을 사용해 분석이 적절하게 수행되었는지 확인해야한다. 피부자극이나 전신독성을 과도하게 야기 시키지 않고 유도를 재현할 수 있고 과도하지 않은 물질 (  $1.8 < \text{자극지수(SI)} < 10$  ) 을 선택해야 한다. 선호되는 양성대조군 실험물질은 acetone : olive oil (4:1, v/v) 에 25% hexyl cinnamic aldehyde (Chemical Abstracts Service[CAS] No 101-86-0) 또는 acetone : olive oil (4:1, v/v)에 25% eugenol (CAS No 97-53-0)이다. 충분한 근거가 있을 때, 위의 기준에 맞는 다른 양성대조군 시험물질이 사용 될 수 있다.

12-1-22-3-4-2. 용매대조군: 용매로 사용된 물질을 사용한다.

12-1-22-3-5. 용매의 선택: 용매의 경우 실험결과에 영향을 주지 않아야 하며, 추천되는 용매는 acetone : olive oil (4:1 v/v), *N,N*-dimethylformamide, methyl ethyl ketone, propylene glycol, dimethylsulphoxide 이며, 과학적으로 충분한 근거가 있다면 다른 것을 사용할 수 있다. 적절한 가용화제

(solubilisers - 1% Pluronic® L92)를 용매에 포함시켜 물질 처리 후 즉시 흘러내려가지 않게 한다.

#### 12-1-22-4. 처리방법

##### 12-1-22-4-1. 1일- 물질처리

12-1-22-4-1-1. 각 동물의 체중, 귀 두께 측정 및 임상증상을 개별적으로 확인하고 기록한다.

12-1-22-4-1-2. 1% sodium lauryl sulfate (SLS)수용액에 살짝 담근 브러시를 사용하여 양쪽 귓등 (뒷면)에 각각 4-5회 적용한다.

12-1-22-4-1-3. SLS 처리 1시간 후 용매대조군, 시험물질군, 양성대조군 물질 25ul를 양쪽 귓등에 각각 처리한다.

##### 12-1-22-4-2. 2, 3, 7일- 물질처리

12-1-22-4-2-1. 1일째 1% SLS 수용액 처리 등 동일한 절차로 반복한다.

##### 12-1-22-4-3. 4, 5, 6일- 휴지기

12-1-22-4-3-1. 처리하지 않는다.

##### 12-1-22-4-4. 8일- 귀 두께 측정 및 림프절 분리

12-1-22-4-4-1. 각 동물의 체중과 임상증상을 개별적으로 확인하고 기록한다.

12-1-22-4-4-2. 마지막 처리(7일차)을 시작으로 대략 24-30시간 이후 동물을 인도적으로 처리한다.

12-1-22-4-4-3. 귀의 홍반 관찰 및 귀 두께 측정 ( 또는 귀 무게측정)

12-1-22-4-4-4. 양쪽 귀의 림프절을 분리하여 각각 phosphate buffered saline (PBS)로 나눈다.

#### 12-1-22-5. 세포현탁액 준비 (Preparation of Cell suspensions)

12-1-22-5-1. 마우스의 이개 림프절(lymph node cell, LNC)을 분리하여 glass slides와 cell scraper를 이용하여 1ml PBS에 단일세포를 균질화 한다.

12-1-22-5-2. PBS 1.98ml에 균질화된 세포현탁액 20ul을 혼합한다.

12-1-22-5-3. 개체 당 두 개(양쪽)의 세포현탁액을 준비한다.

#### 12-1-22-6. 세포의 증식 측정 (Determination of cellular proliferation)

12-1-22-6-1. Luciferin/luciferase를 이용한 ATP 측정 kit 사용하여 림프절에서의 ATP 양을 Relative luminescence Units(RLU)로 측정한다.

12-1-22-6-2. ATP는 동물의 부검 후 서서히 감소하기 때문에 부검에서 분석시 간까지 대략 30분 내로 일정하여야 한다.

#### 12-1-22-7. 관찰항목

- 12-1-22-7-1. 임상관찰: 물질처리 적용면의 국부 자극성이나 전신독성의 임상증상을 적어도 하루에 한번은 주의 깊게 관찰하고, 개별적으로 체계적으로 기록한다.
- 12-1-22-7-2. 체중측정: 시험물질을 투여하기 직전에 각 동물의 체중을 재고 부검 시 개별적인 동물 체중을 측정한다.

**12-1-23. 피부감작성시험: 국소림프절시험법-BrdU-ELISA(Local Lymph Node Assay- BrdU-ELISA) <12·02·07 신설>**

- 12-1-23-1. 시험농약: 원제 및 품목
- 12-1-23-2. 시험동물
- 12-1-23-2-1. 시험동물 및 계통: 국소림프절시험법-BrdU-ELISA에서는 CBA/J 계통의 마우스가 선호되며, 종 특이성이 없다는 것을 증명하는 데이터가 있을 때 다른 종이 사용될 수 있다. 국소림프절시험법-BrdU-FCM에서는 BALB/c 마우스가 선호되며, CBA/J 종도 사용될 수 있다. <개정 2019.3.21.>
- 12-1-23-2-2. 연령: 건강하고 성숙된 동물로서 임신 및 출산경험이 없는 개체를 선발하되, 투여를 시작할 때 8주-12주령 사이의 평균체중 20%를 초과하지 않는 범위 내에서 균일한 개체를 선발한다.
- 12-1-23-2-3. 성별: 암컷을 사용 하는 것을 원칙으로, 성별 차이가 없다는 것을 증명하는 데이터가 있을 때는 수컷이 사용될 수 있다.
- 12-1-23-2-4. 시험동물 수: 처리그룹 당 최소 4마리 동물을 사용하며, 물질처리는 최소 3개 이상의 농도로 처리하여야 한다.
- 12-1-23-3. 처리농도 수준 설정
- 12-1-23-3-1. 투여용액: 고체의 시험물질인 경우 마우스 귀에 적용하기 전 적절한 용매에 녹이거나 희석하여 사용할 수 있다. 액체의 시험물질의 경우 희석시키거나 원제 그대로를 사용할 수 있다.
- 12-1-23-3-2. 투여농도설정: 0.5%, 1%, 2.5%, 5%, 10%, 25%, 50%, 100% 등과 같은 적절한 연속적 농도로 처리를 하며, 시험물질의 독성학적 정보, 구조 및 물리화학적인 정보가 존재하는 경우에는 전신독성 및 국부적 피부자극성을 피하는 범위에서 최고농도의 연이은 3 농도를 선택한다. 독성학적 정보가 없을 경우에는 예비실험을 필요로 한다. <개정 2019.3.21.>
- 12-1-23-3-3. 예비실험: 예비실험은 최고투여량의 정보가 없을 경우 적절한 투여량을 정하기 위해 수행된다. 예비실험에서 사용되는 테스트 물질은 액체

또는 고체, 현탁액의 최대 농도가 100%가 되어야한다. 시험 동물 수는 투여 그룹 당 한 마리 또는 두 마리가 추천된다. 나머지 조건은 본 실험과 동일한 조건하에서 수행된다.

#### 12-1-23-3-4. 대조군 설정

12-1-23-3-4-1. 양성대조군: 양성대조군을 사용해 분석이 적절하게 수행되었는지 확인해야한다. 피부자극이나 전식독성을 과도하게 야기 시키지 않고 유도를 재현할 수 있고 과도하지 않은 물질 (LLNA:BrdU-ELISA 시험  $1.6 \leq$  감작지수(SI)  $< 14$ ; LLNA:BrdU-FCM 시험  $2.7 \leq$  감작지수(SI)  $< 27$ ) 을 선택해야 한다. 선호되는 양성대조군 실험물질은 acetone : olive oil (4:1, v/v) 에 25% hexyl cinnamic aldehyde (Chemical Abstracts Service[CAS] No 101-86-0) 또는 acetone : olive oil (4:1, v/v)에 25% eugenol (CAS No 97-53-0)이다. 충분한 근거가 있을 때, 위의 기준에 맞는 다른 양성대조군 시험물질이 사용 될 수 있다. <개정 2019.3.21.>

12-1-23-3-4-2. 용매대조군: 용매로 사용된 물질을 사용한다.

12-1-23-3-5. 용매의 선택: 용매의 경우 실험결과에 영향을 주지 않아야 하며, 추천되는 용매는 acetone : olive oil (4:1 v/v), *N, N*-dimethylformamide, methyl ethyl ketone, propylene glycol, dimethylsulphoxide 이며, 과학적으로 충분한 근거가 있다면 다른 것을 사용할 수 있다. 적절한 가용화제 (solubilisers - 1% Pluronic® L92)를 용매에 포함시켜 물질 처리 후 즉시 흘러내려가지 않게 한다.

#### 12-1-23-4. 처리방법

##### 12-1-23-4-1. 1일- 물질처리

12-1-23-4-1-1. 각 동물의 체중, 귀 두께 측정 및 임상증상을 개별적으로 확인 하고 기록한다.

12-1-23-4-1-2. 용매대조군, 시험물질군, 양성대조군 물질 25ul를 양쪽 귓등에 각각 처리한다.

##### 12-1-23-4-2. 2일 및 3일 - 물질처리 <개정 2020.2.28.>

12-1-23-4-2-1. 1일째 처리와 동일한 절차로 반복한다.

12-1-23-4-2-2. 국소림프절시험법-BrdU-FCM에서는 3일째에 귀 두께를 측정한다. <신설 2019.3.21.>

##### 12-1-23-4-3. 4일- 휴지기

12-1-23-4-3-1. 처리하지 않는다.

12-1-23-4-4. 5일- 복강투여

12-1-23-4-4-1. 국소림프절시험법-BrdU-ELISA에서는 BrdU (5-bromo-2-deoxyuridine, 10mg/ml) 용액 0.5ml (5mg/마우스)를 복강투여한다. 국소림프절시험법-BrdU-FCM에서는 BrdU (20mg/ml) 용액 0.1ml (2mg/마우스)를 복강투여한다.  
<개정 2019.3.21.>

12-1-23-4-5. 6일- 귀 두께 측정 및 림프절 분리

12-1-23-4-5-1. 각 동물의 체중과 임상증상을 개별적으로 확인하고 기록한다.

12-1-23-4-5-2. 복강투여 약 24시간 후 동물을 인도적으로 처리한다.

12-1-23-4-5-3. 귀의 홍반 관찰 및 귀 두께 측정 ( 또는 귀 무게측정)

12-1-23-4-5-4. 양쪽 귀의 림프절을 분리하여 각각 phosphate buffered saline (PBS)로 나눈다.

12-1-23-5. 세포현탁액 준비 (Preparation of Cell suspensions)

12-1-23-5-1. 마우스의 이개 림프절(lymph node cell, LNC)을 분리하여 70um nylon mesh 등을 이용하여 단일세포를 분리한다. <개정 2019.3.21.>

12-1-23-5-2. 국소림프절시험법-BrdU-ELISA에서는 개체별로 분리된 림프절 단일세포를 15 ml PBS에 분산시킨다. 국소림프절시험법-BrdU-FCM에서는 림프절 단일세포를 2 ml PBS에 분산시키고, 세포수를 측정하여  $1.5 \times 10^6$  개의 세포를 준비한다. <개정 2019.3.21.>

12-1-23-6. 세포의 증식 측정 (Determination of cellular proliferation)

12-1-23-6-1. BrdU는 ELISA kit를 이용해서 측정한다.

12-1-23-6-2. 370nm 와 492nm 파장에서 흡광도를 측정한다.

12-1-23-7. 관찰항목

12-1-23-7-1. 임상관찰: 물질처리 적용면의 국부 자극성이나 전신독성의 임상증상을 적어도 하루에 한번은 주의 깊게 관찰하고, 개별적으로 체계적으로 기록한다.

12-1-23-7-2. 체중측정: 시험물질을 투여하기 직전에 각 동물의 체중을 재고 부검 시 개별적인 동물 체중을 측정한다.

**12-1-24. 급성경피독성시험: 고정용량법 <신설 2018.12.17.>**

12-1-24-1. 시험농약 : 제품 또는 원제

12-1-24-2. 시험동물

12-1-24-2-1. 동물종 및 계통 : 랫드(SPF 동물)의 사용을 원칙으로 하되 일반

적으로 독성시험에 광범위하게 사용되는 계통을 선정한다.

12-1-24-2-2. 연령 : 건강하고 성숙된 동물로서 임신 출산경험이 없는 개체를 선발하되, 투여를 시작할 때 8-10주가 되어야 하고 평균 체중의  $\pm 20\%$  범위 내에서 균일한 개체를 사용한다.

12-1-24-2-3. 성별: 급성경구독성시험(고정용량법)에 준한다.

12-1-24-2-4. 시험동물 수: 각 시험약량 수준 당 한쪽 성으로 된 두 마리의 동물을 사용한다. 예비 시험에서는 선택된 약량 수준 당 한 마리의 동물을 사용한다.

12-1-24-3. 시험 약량 수준 설정 및 약제의 조제

12-1-24-3-1. 시험 약량 수준(dose levels and selection)

12-1-24-3-1-1. 예비 시험: 예비 시험의 시작 약량은 동일한 화학물질이나 구조적으로 유사한 화학물질 체내·체외 데이터에 근거하여 50, 200, 1000, 2000 mg/kg bw의 고정 약량 수준에서 선택한다. 시험 물질에 대한 충분한 정보가 없을 경우는 시작 약량을 200 mg/kg bw으로 선택한다. 예비 시험 최저 약량(50mg/kg bw)에서 실험동물 한 마리가 치사한 경우에는 시험을 종료시키고 해당 물질을 구분 1로 분류한다.

12-1-24-3-1-2. 본시험: 예비 시험의 결과에 따라 시작 약량을 200, 1000, 2000 mg/kg bw 수준에서 선택하여 본시험을 수행한다.

12-1-24-3-2. 용매(vehicle)의 선택 : 시험 물질이 고상인 경우 증류수(0.5-1 mL)를 이용하여 연고상(moistened) 상태로 처리한다. 증류수 이외의 용매를 이용할 경우, 시험물질의 피부 침투성에 대한 용매의 영향이 고려되어야 한다.

12-1-24-4. 처리방법

12-1-24-4-1. 체모제거 : 시험 개시전에 약제처리를 위한 시험동물 등부위의 체모를 가급적 넓게 삭발하되 피부가 손상되지 않도록 주의한다.

12-1-24-4-2. 처리방법 : 약제처리면적은 체표면적이 10%정도로 하고 시험약제가 액상인 경우는 원액을 바르고 고상인 경우에는 연고상으로 하여 균일하게 바른 다음 시험농약의 유실을 방지하기 위하여 비자극성 테이프로 24시간 고정시켜 준다.

12-1-24-4-3. 처리약제의 제거: 증류수나 적절한 용매를 이용하여 남아 있는 약제를 제거한다.

12-1-24-5. 관찰기간 : 투여 후 처음 30분 동안 최소한 한번은 실험동물을 개별

적으로 관찰한다. 처음 24시간 동안 주기적으로 실험동물을 관찰하되, 투여 후 2-6시간 동안은 주의를 기울여 관찰한다. 총 14일 동안 동물을 관찰하며 관찰 기간은 독성 반응, 발병시간, 회복기간에 따라 필요한 경우 결정될 수 있다.

12-1-24-6. 관찰항목

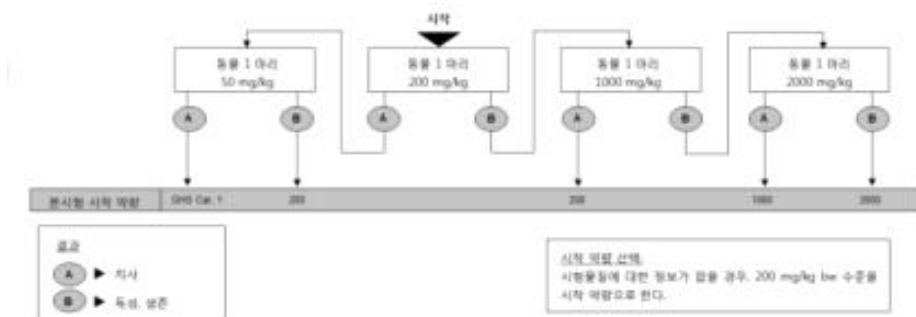
12-1-24-6-1. 임상 증상 관찰: 피부와 털, 눈과 점막에서의 변화, 호흡기, 순환계, 자율신경계 및 중추신경계의 변화, 활동 및 행동 경향의 변화를 관찰한다. 떨림(tremors), 경련(convulsion), 침분비(salivation), 설사(diarrhoea), 무기력(lethargy), 수면(sleep), 혼수상태(comma)를 주의하며 관찰한다. 시험물질 제거 후 24, 48, 72 시간에 홍반/가피와 부종을 관찰하여 피부반응 평가표(Draize criteria)에 따라 피부반응을 평가할 수도 있다.

12-1-24-6-2. 체중 측정: 급성경구독성시험(고정용량법)에 준함.

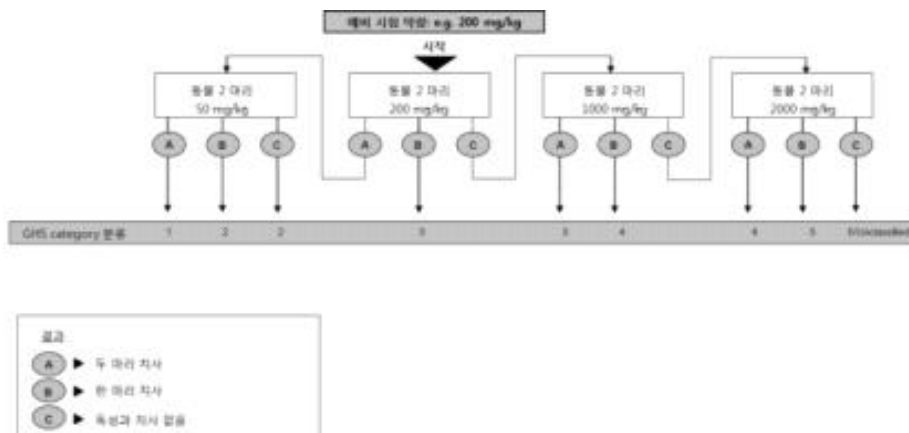
12-1-24-6-3. 부검 소견: 급성경구독성시험(고정용량법)에 준함.

12-1-24-7. 예비시험, 본시험의 순서도에 따라 수행한다.

<예비시험 순서도>



<본시험 순서도>



12-1-25. 급성흡입독성: 고정용량법 <신설 2018.12.17.>

12-1-25-1. 시험농약 : 급성흡입독성시험에 준함.

12-1-25-2. 시험동물

12-1-25-2-1. 동물종 및 계통 : 랫드(SPF 동물)의 사용을 원칙으로 하되 일반적으로 독성시험에 광범위하게 사용되는 계통을 선정한다. 랫드 이외의 다른 설치류, 비설치류를 사용하였을 경우에는 그 선정 이유를 밝혀야 한다.

12-1-25-2-2. 연령 : 건강하고 성숙된 동물로서 임신 및 출산경험이 없는 개체를 선발하되 투여를 시작할 때 8-12주가 되어야 하고 평균 체중의  $\pm 20\%$  범위 내에서 균일한 개체를 사용한다.

12-1-25-2-3. 성별 : 예비 시험에서는 암수 동물을 사용한다. 예비시험에서 성별간 독성발현의 차이가 현저하게 나타날 경우에는 본시험 시, 더 민감한 성별의 동물을 사용한다. 성별간 독성발현 차이가 나타나지 않을 경우 본시험에서 수컷을 사용한다.

12-1-25-2-4. 시험동물 수: 각 시험농도 수준 당 한쪽 성으로 된 다섯 마리의 동물을 사용한다. 예비 시험에서는 선택된 농도 수준 당 암수컷 각 한 마리의 동물을 사용한다.

12-1-25-3. 처리농도 수준 및 약제의 조제

12-1-25-3-1. 처리농도 수준

12-1-25-3-1-1. 예비시험: 가장 민감한 성별의 동물과 본시험에서의 농도를 설정하기 위한 정보가 없을 때, 예비시험을 수행한다. 예비 시험의 시작 농도는 동일한 화학물질이나 구조적으로 유사한 화학물질 체내·체외 데이터에 근거하여 에어로졸은 0.05, 0.5, 1, 5 mg/L 의 고정 농도 수준에서 선택한다. 증기는 0.5, 2, 10, 20 mg/L의 고정 농도 수준에서 선택하며 가스는 100, 500, 2500, 20000 ppm의 고정 농도 수준에서 선택한다. 시험 물질에 대한 충분한 정보가 없을 경우는 시작 농도를 에어로졸은 1 mg/L, 증기는 10 mg/L, 가스는 2500 ppm으로 선택한다. 예비 시험 최저 농도에서 실험동물 한 마리가 치사한 경우에는 시험을 종료시키고 해당 물질을 구분 1로 분류한다. 예비 시험에서 한 성별이 더 민감하게 독성이 나타나면 민감한 성별의 동물을 이용하여 추가 예비시험을 수행한다.

12-1-25-3-1-2. 본시험: 예비 시험의 결과에 따라 시작 농도를 에어로졸은 0.05, 0.5, 1, 5 mg/L, 증기는 0.5, 2, 10, 20 mg/L, 가스는 100, 500, 2500, 20000 ppm 수준에서 선택하여 본시험을 수행한다.

12-1-25-3-1-3. 한계시험: 동일한 화학물질이나 구조적으로 유사한 화학물질 체

내·체외 데이터에 근거하여 시험물질이 독성이 없다고 판단될 때 한계시험을 수행한다. 시작 농도를 에어로졸은 5 mg/L, 증기는 20 mg/L, 가스는 20000 ppm으로 선택한다. 에어로졸의 경우에는 호흡 가능한 입자 크기 (MMAD 4 $\mu$ m 이하)를 얻어야 하며 2 mg/L보다 높은 농도에서 에어로졸 시험을 할 경우, 호흡 가능한 입자크기가 얻어질 수 있을 때만 시험한다.

#### 12-1-25-4. 처리방법

12-1-25-4-1. 용매사용 : 시험약제의 적당한 농도를 유지시키기 위해 필요시는 적당한 용매를 사용할 수 있다.

12-1-25-4-2. 노출방법 : 흡입독성 실험 장치를 사용하여 전신노출 또는 두부/코노출로 하며 노출시간은 최소한 4시간 1회로 한다.

12-1-25-4-3. 흡입 챔버내 조건 및 급여 : 흡입 챔버내 산소량은 19%이상 유지해야 하며 온도는 22 $^{\circ}$ C $\pm$ 3, 상대습도는 30~70%로 유지해야 한다. 노출기간 동안에는 사료 및 물의 급여를 중단한다.

12-1-25-5. 대조군의 설정 : 노출 환경 중에서의 적절한 농도를 유지시키기 위해 용매를 사용하였을 경우에 그 용매의 독성을 모를 때는 필요에 따라 용매 대조군을 설정한다.

12-1-25-6. 관찰기간 : 약제처리 당일은 최소 2번 관찰하며 그 다음날부터는 최소 1일 1회로 14일 이상 관찰하되 약제 특성에 따라 관찰 기간을 연장할 수 있다. 예비시험은 각 시험 간 24시간의 간격을 두고 수행하며 최소 1주일 동안 실험동물을 관찰한다. 본시험에서는 지연독성을 관찰하기 위해 각 시험 간 3-4일간의 간격을 두고 수행한다.

#### 12-1-25-7. 물리적 측정

12-1-25-7-1. 공기의 유속, 온도, 습도는 계속적으로 측정되어야 하며 30분마다 기록하여야 한다.

12-1-25-7-2. 노출기간동안 피검물질의 농도는 평균 값에 대해 가스와 증기는  $\pm$ 10 % 이상, 액체 또는 고체 에어로졸은  $\pm$ 20 % 이상 벗어나지 않아야 한다.

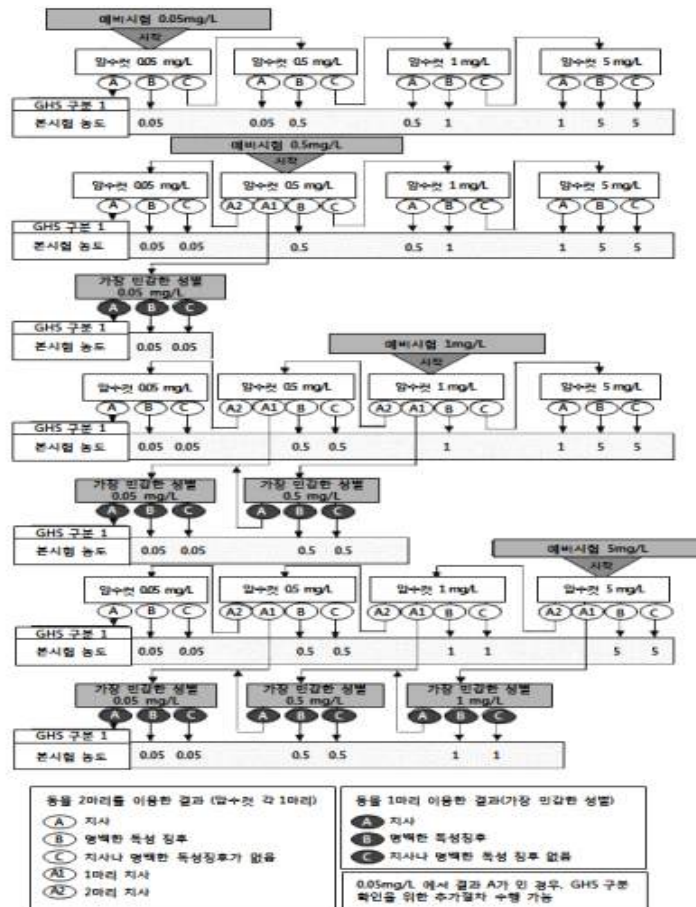
12-1-25-8. 임상관찰 : 빈사상태의 동물은 치사한 동물로 판정하고 안락사 한다 (결과A). 명백한 독성징후(evident toxicity)에는 떨림(tremors), 활동저하(hypoactivity), 불규칙적인 호흡(irregular respiration), 10 % 초과 체중감소가 있으며, 1마리 이상의 동물에서 명백한 독성징후가 관찰되면 순서도에 서 결과B로 판정한다.

12-1-25-9. 체중측정 : 노출 바로 전, 노출 후 1, 3, 7, 14일에 개체별 체중을 측정한다. 노출일과 비교했을 때 체중이 10 % 초과하여 감소한 경우 독성영향으로 판단한다.

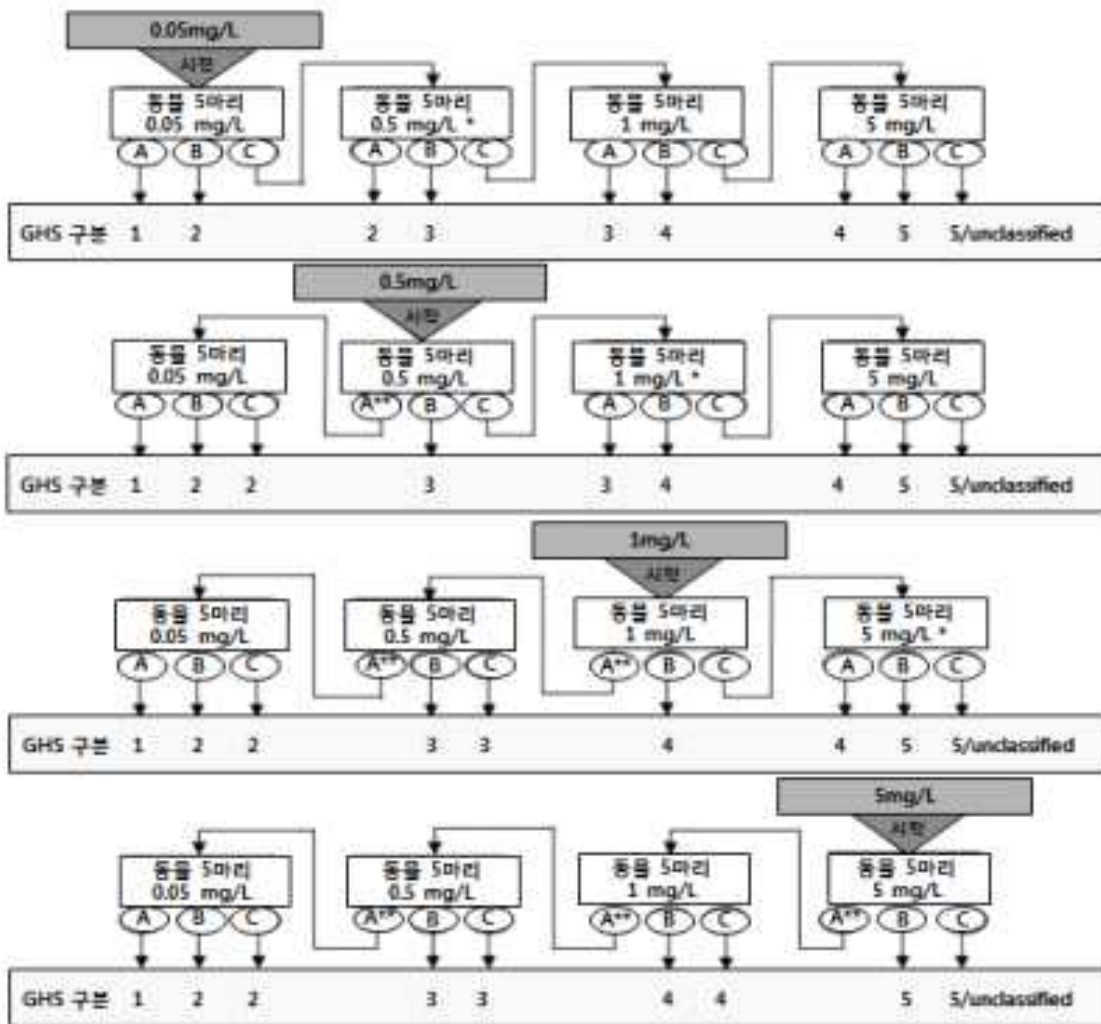
12-1-25-10. 부검조건 : 시험 중 폐사동물 및 시험 종료후 생존동물에 대한 부검조건을 기록하여야 한다.

12-1-25-11. 예비시험, 본시험의 순서도에 따라 수행한다.

<에어로졸 예비시험 순서도>



<에어로졸 분시험 순서도>



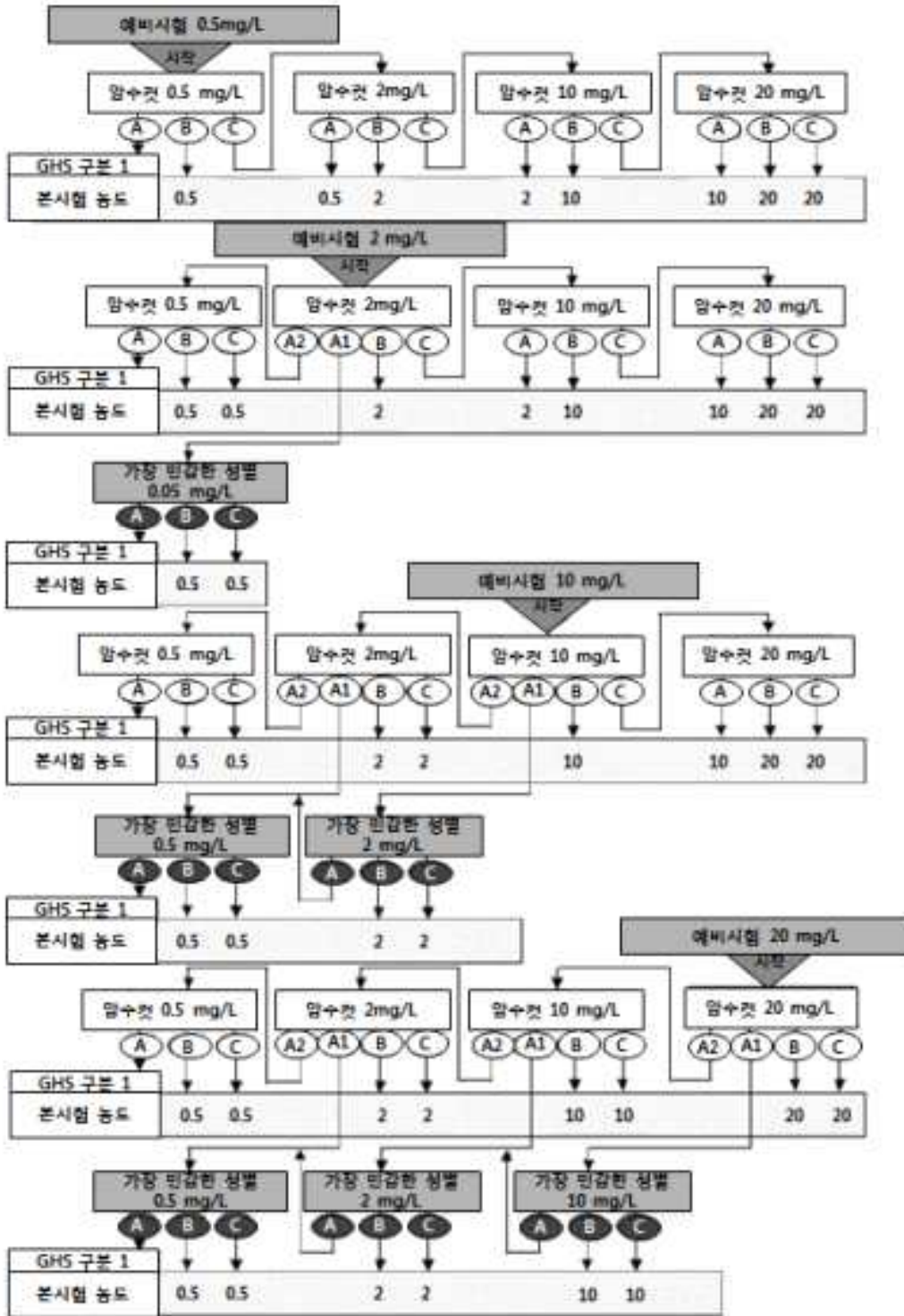
결과 판정  
(가장 민감한 성별 5마리 또는 암컷 5마리)

- (A) 2마리 이상 치사
- (B) 1마리 이상 명백한 독성 징후 또는 1마리 치사
- (C) 치사나 명백한 독성징후가 없음

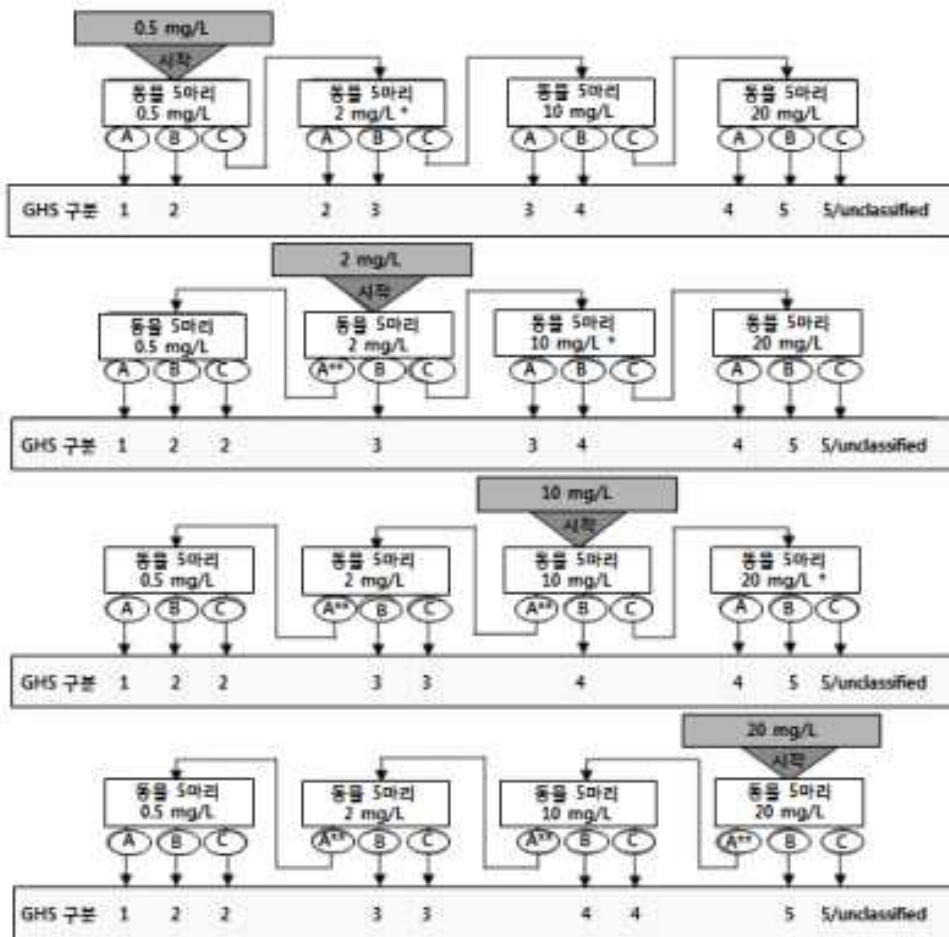
\* 예비실험에서 치사를 유발하면, 추가 동물 실험을 하지 않고 A로 판정

\*\* 2-3마리 치사 발생하면, B 또는 C를 구분 하기 위해 다음 아래 단계의 시험을 수행

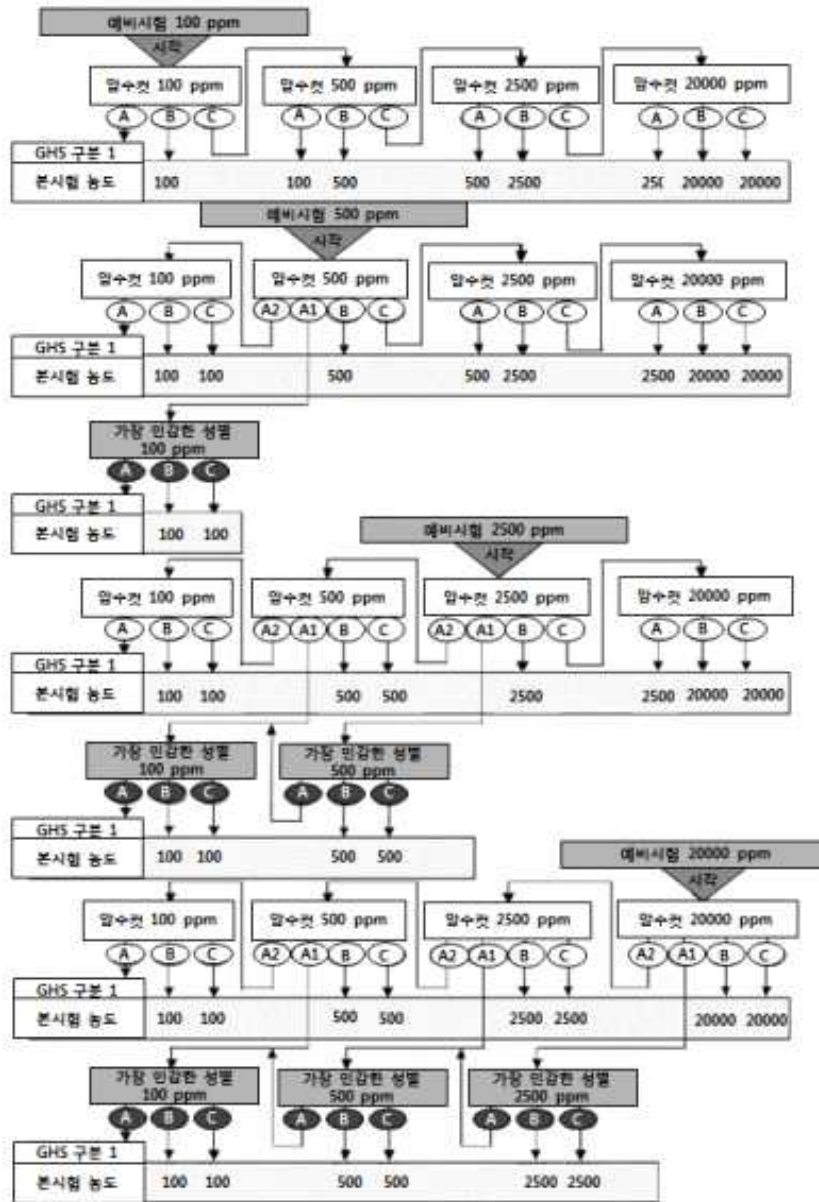
<중기 예비시험 순서도>



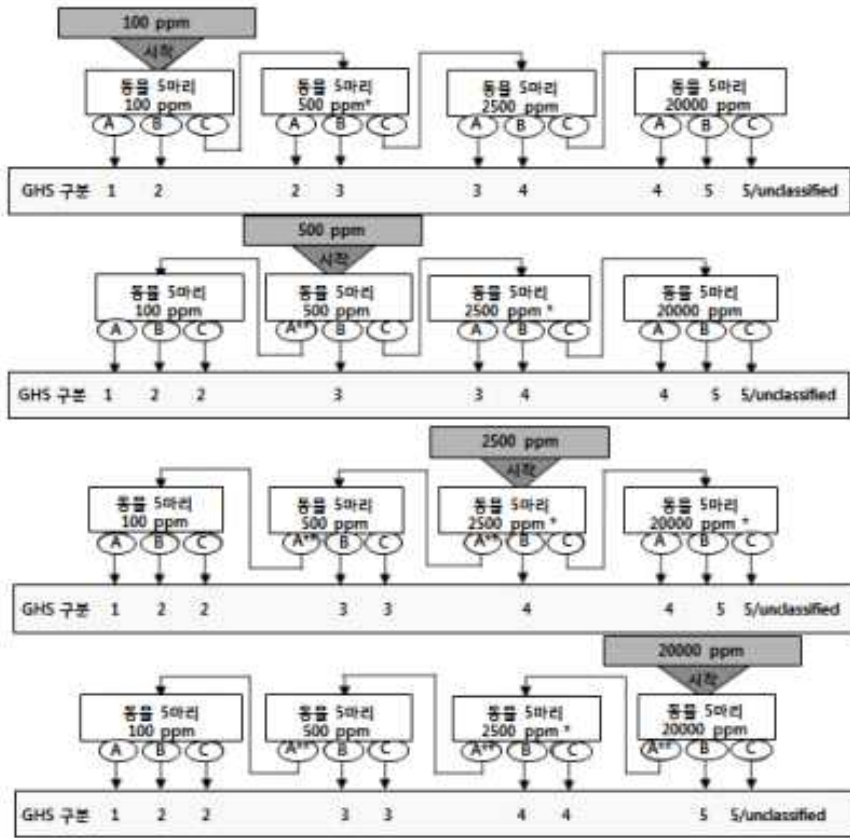
<중기 본시험 순서도>



<가스 예비시험 순서도>



<가스 분시험 순서도>



<p>결과 판정 (가장 민감한 성별 5마리 또는 암컷 5마리)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>(A) 2마리 이상 지사</li> <li>(B) 1마리 이상 명백한 독성 징후 또는 1마리 지사</li> <li>(C) 지사나 명백한 독성징후가 없음</li> </ul>	<p>* 예비실험에서 지사를 유발하면, 추가 동물 실험을 하지 않고 A로 판정</p> <p>** 2-3마리 지사 발생하면, B 또는 C를 구분하기 위해 다음 아래 단계의 실험을 수행</p>
--	---

## 12-1-26. 급성흡입독성: 독성등급법 <신설 2018.12.17.>

12-1-26-1. 시험농약 : 급성흡입독성시험에 준함.

12-1-26-2. 시험동물

12-1-26-2-1. 동물종 및 계통 : 급성흡입독성시험(고정용량법)에 준함.

12-1-26-2-2. 연령 : 급성흡입독성시험(고정용량법)에 준함.

12-1-26-2-3. 성별 및 시험동물 수: 본 시험 또는 한계시험에서는 단계마다 암수 각 3마리의 실험동물을 사용한다. 암수 중 더 감수성이 더 크다는 과학적 증거가 있어 한쪽 성별을 이용할 경우에는 6마리를 사용한다.

12-1-26-3. 처리농도 수준 및 약제의 조제

12-1-26-3-1. 처리농도 수준

12-1-26-3-1-1. 본시험: 가장 강한 독성증상이 나타날 것으로 예상되는 농도를 시작 농도로 설정한다. 가스는 100, 500, 2500, 20000 ppm, 증기는 0.5, 2, 10, 20 mg/L, 에어로졸은 0.05, 0.5, 1, 5 mg/L 수준에서 시작 농도를 설정한다. 결과에 따라 다음단계에서의 시험을 진행한다.

12-1-26-3-1-2. 한계 시험: 동일한 화학물질이나 구조적으로 유사한 화학물질 체내·체외 데이터에 근거하여 시험물질이 독성이 없다고 판단될 때 한계시험을 수행한다. 가스는 20000 ppm, 증기는 20 mg/L, 에어로졸은 5 mg/L로 수행한다. 에어로졸의 경우에는 호흡 가능한 입자 크기(MMAD 1-4  $\mu\text{m}$ )를 얻어야 하며 2 mg/L보다 높은 농도에서 에어로졸 시험을 할 경우, 호흡 가능한 입자크기가 얻어질 수 있을 때만 시험한다.

12-1-26-4. 처리방법

12-1-26-4-1. 용매사용: 시험약제의 적당한 농도를 유지시키기 위해 필요시는 적당한 용매를 사용할 수 있으며, 일반적으로 물을 사용할 수 있다.

12-1-26-4-2. 입자크기: 에어로졸에 대해 시험할 때 호흡 가능한 입자크기(1~4  $\mu\text{m}$ )를 얻어야 한다.

12-1-26-4-3. 노출방법 : 코노출 방법의 사용을 선호하나 전신노출 방법 사용이 가능하다. 전신노출 방법을 사용 시 이에 대한 이유를 명시해야 한다. 노출 시간은 최소한 4시간 1회로 한다.

12-1-26-4-4. 흡입 챔버내 조건 및 급여 : 흡입 챔버내 산소량은 19 %이상 유지해야 하며 온도는  $22\pm 3$  °C, 상대습도는 30~70 %로 유지해야 하고 노출기간 동안에는 사료 및 물의 급여를 중단한다.

12-1-26-5. 대조군의 설정 : 노출 환경 중에서의 적절한 농도를 유지시키기 위

해 용매를 사용하였을 경우에 그 용매의 독성을 모를 때는 필요에 따라 용매 대조군을 설정한다.

12-1-26-6. 관찰기간 : 약제처리 당일은 수시로(최소 2회) 관찰하고 그 다음날 부터는 최소한 1일 1회로 14일이상 관찰하되 약제 특성에 따라 관찰 기간을 연장할 수 있다. 본시험에서는 지연독성을 관찰하기 위해 각 시험 간 3-4일 간의 간격을 두고 수행한다.

12-1-26-7. 물리적 측정

12-1-26-7-1. 공기의 유속, 온도, 습도는 계속적으로 측정되어야 하며 30분마다 기록하여야 한다.

12-1-26-7-2. 노출기간동안 피검물질의 농도는 항상 일정하여야 한다. 노출기간 동안 피검물질의 농도는 평균 값에 대해 가스와 증기는  $\pm 10\%$  이상, 액체 또는 고체 에어로졸은  $\pm 20\%$  이상 벗어나지 않아야 한다.

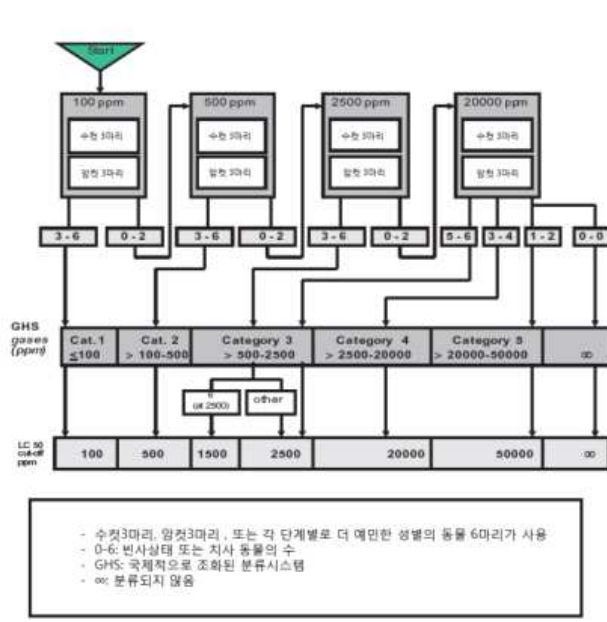
12-1-26-8. 임상관찰 : 피부와 털, 눈과 점막 그리고/또한 호흡기, 순환기, 자율 신경계와 중추신경계, 그리고 신체활동과 행동 패턴을 관찰한다. 또한 가능하다면 모든 국소적 전신적 효과에 대한 차이가 기록되어야 하며 진전, 경련, 타액 분비, 설사, 무기력, 수면, 혼수상태를 주의하여 관찰해야 한다.

12-1-26-9. 체중측정 : 노출 바로 전, 노출 후 1, 3, 7, 14일에 개체별 체중을 측정한다. 노출일과 비교했을 때 체중이 20% 이상 감소한 경우 독성영향으로 판단한다.

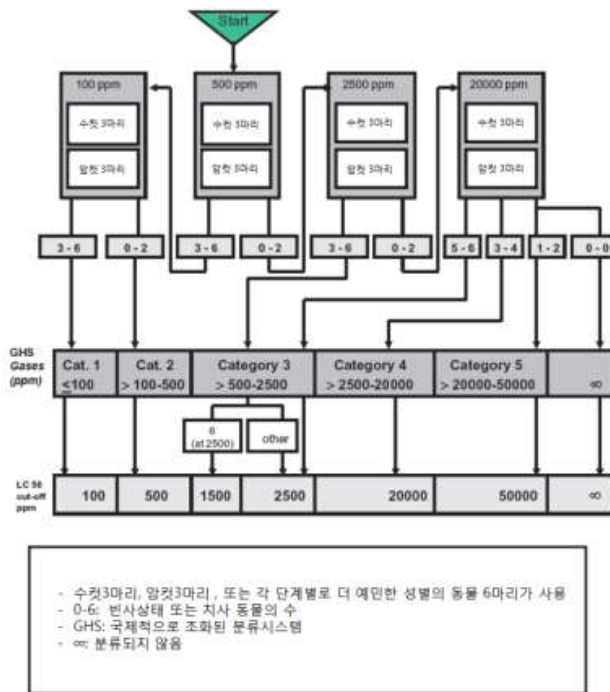
12-1-26-10. 부검소견 : 시험 중 폐사동물 및 시험 종료 후 생존동물에 대한 부검소견을 기록하여야 한다.

12-1-26-11. 순서도에 따라 수행한다.

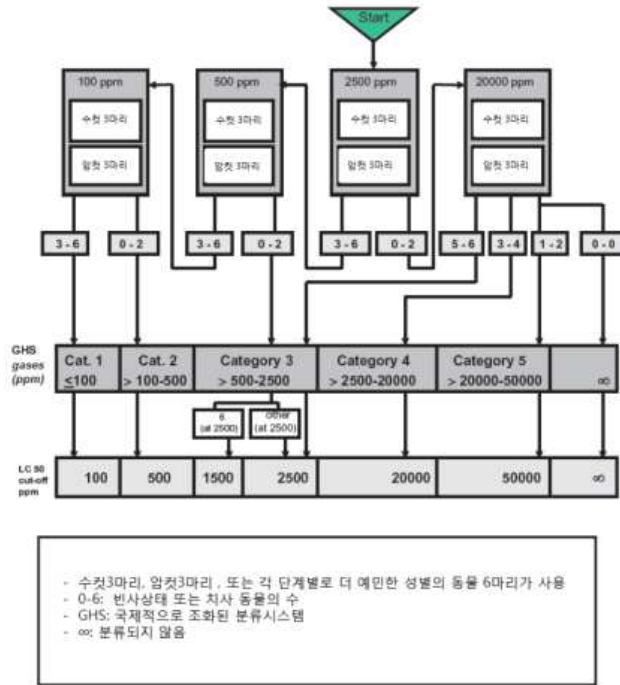
<가스(gas) 시작 농도 100 ppm 순서도>



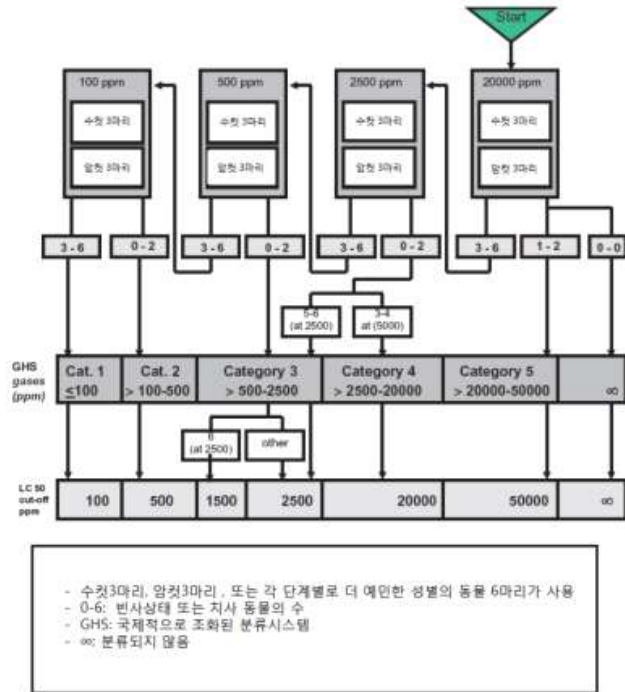
<가스(gas) 시작 농도 500 ppm 순서도>



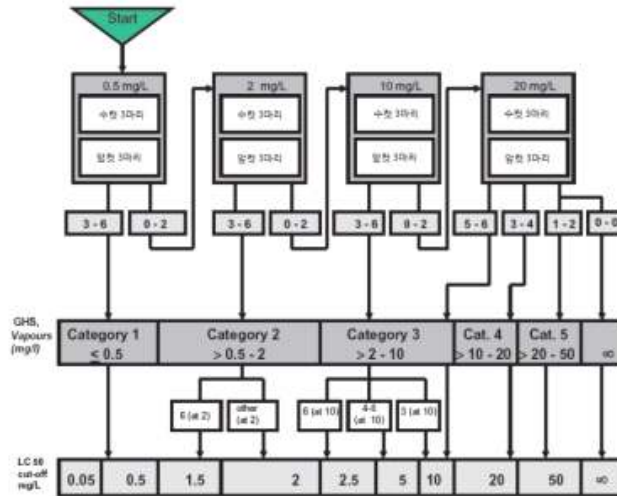
<가스(gas) 시작 농도 2500 ppm 순서도>



<가스(gas) 시작 농도 20000 ppm 순서도>

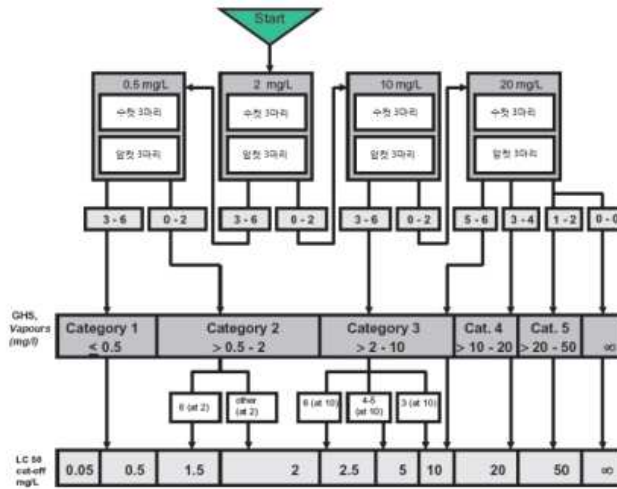


<증기(vapour) 시작 농도 0.5 mg/L 순서도>



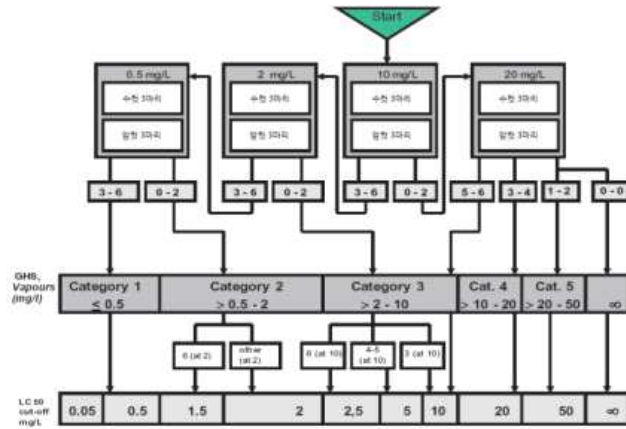
- 수컷3마리, 암컷3마리, 또는 각 단계별로 더 예민한 성별의 동물 6마리가 사용
- 0-6: 번사상태 또는 치사 동물의 수
- GHS: 국제적으로 조화된 분류시스템
- ∞: 분류되지 않음

<증기(vapour) 시작 농도 2 mg/L 순서도>



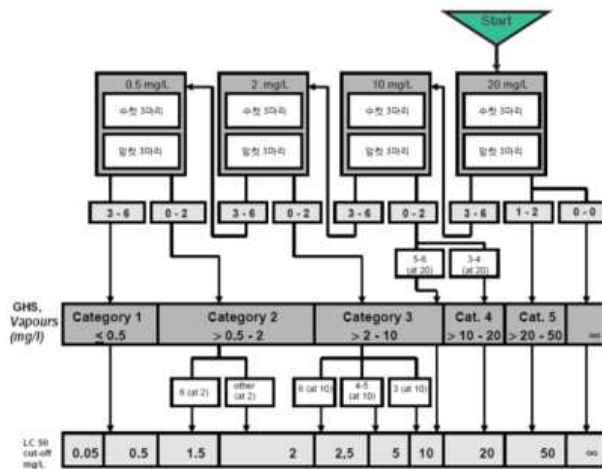
- 수컷3마리, 암컷3마리, 또는 각 단계별로 더 예민한 성별의 동물 6마리가 사용
- 0-6: 번사상태 또는 치사 동물의 수
- GHS: 국제적으로 조화된 분류시스템
- ∞: 분류되지 않음

<증기(vapour) 시작 농도 10 mg/L 순서도>



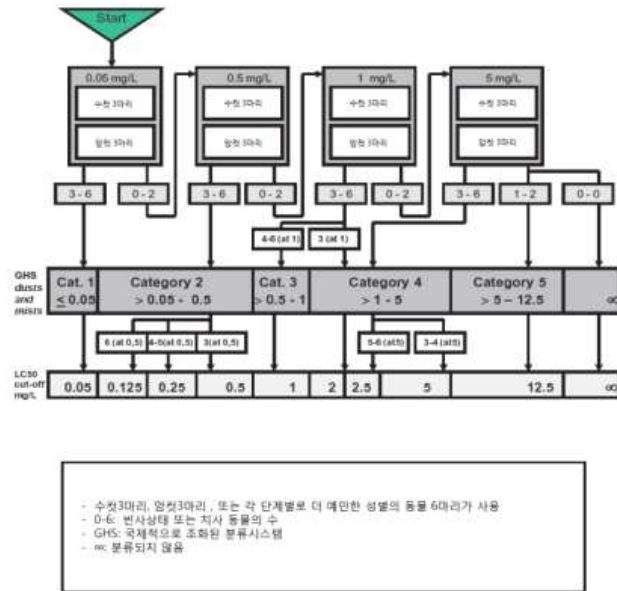
- 수컷3마리, 암컷3마리, 또는 각 단계별로 더 예민한 성별의 동물 6마리가 사용  
 - 0-6: 번식상태 또는 치사 동물의 수  
 - GHS: 국제적으로 조화된 분류시스템  
 - ∞: 분류되지 않음

<증기(vapour) 시작 농도 20 mg/L 순서도>

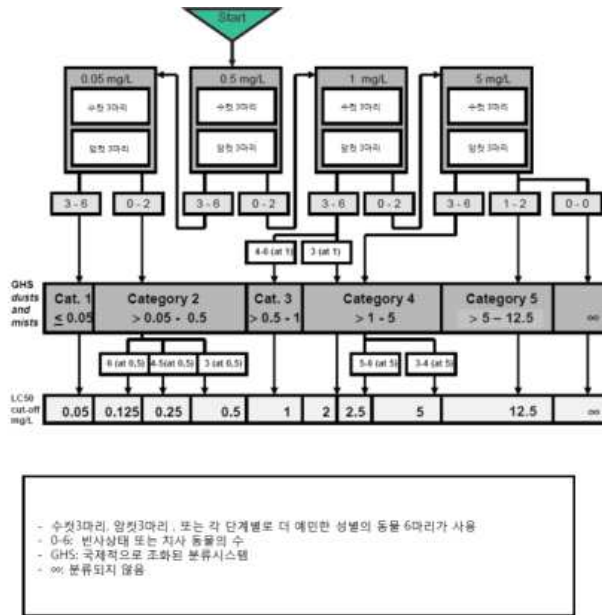


- 수컷3마리, 암컷3마리, 또는 각 단계별로 더 예민한 성별의 동물 6마리가 사용  
 - 0-6: 번식상태 또는 치사 동물의 수  
 - GHS: 국제적으로 조화된 분류시스템  
 - ∞: 분류되지 않음

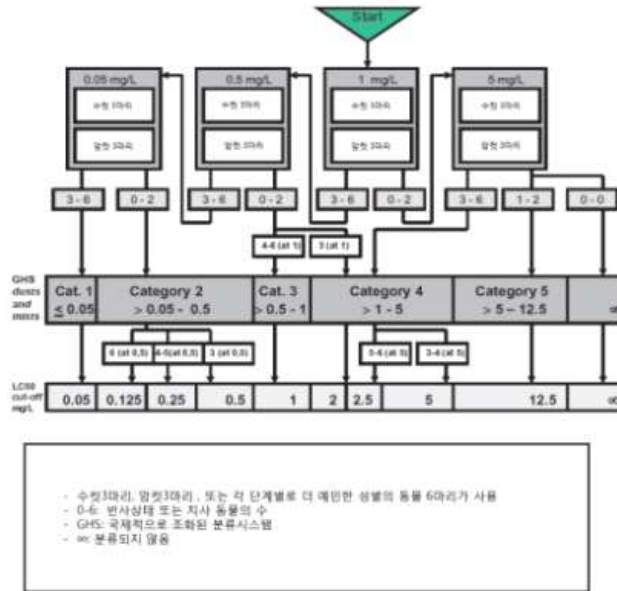
<에어로졸(Aerosols) 시작 농도 0.05 mg/L 순서도>



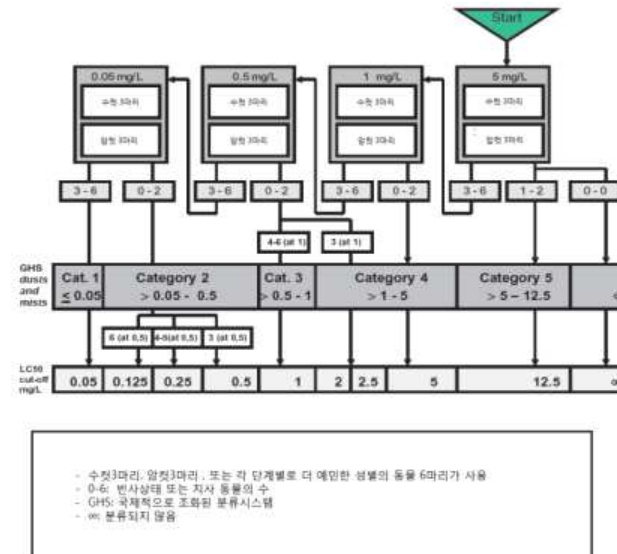
<에어로졸(Aerosols) 시작 농도 0.5 mg/L 순서도>



<에어로졸(Aerosols) 시작 농도 1 mg/L 순서도>



<에어로졸(Aerosols) 시작 농도 5 mg/L 순서도>



**12-1-27. 피부부식성시험: 인체피부모델시험법 (RhE test) <신설 2018.12.1 7.>**

12-1-27-1. 시험농약 : 원제

12-1-27-2. 인체피부모델

12-1-27-2-1. 인체피부모델 종류: 국제적으로 적정성이 검증된 모델을 사용한다. 이외의 인체피부모델을 사용할 때에는 해당 인체피부모델에 대한 신뢰성, 정밀성, 제한점 등에 관한 품질 보증 및 검증 자료를 제출해야 한다.

12-1-27-2-2. 인체피부모델 조건: 인체피부모델을 제작하기 위해서는 비형질전환 케라틴 세포를 사용하여야 한다. 인체피부모델은 각질층(Stratum corneum) 아래에 다수의 표피 세포층 (Basal layer, stratum spinosum, stratum granulosum)이 존재하여야 한다. 또한 방어벽 기능을 가지며 미생물 등에 의해 오염이 되지 않아야 한다.

12-1-27-2-3. 인체피부모델 생존율: 생존율은 MTT법으로 측정하고 MTT 포르마잔 함량은 표준흡광도 측정이나 HPLC/UPLC-분광광도법 측정을 통해 정량한다. 음성대조군의 흡광도는 다음 표를 만족하여야 하며 MTT법에 사용되는 용매 흡광도는 0.1 미만으로 세포생존율의 측정을 방해하지 않아야 한다.

피부 모델	음성대조군 흡광도 범위
EpiSkin™(SM)	0.6 ≤ OD570nm ≤ 1.5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	0.8 ≤ OD570nm ≤ 2.8
SkinEthic™ RHE	0.8 ≤ OD570nm ≤ 3.0
epiCS®	0.8 ≤ OD570nm ≤ 2.8

12-1-27-2-4. 인체피부모델 방어벽 기능: 인체피부모델은 세포독성 지표물질 (SDS 또는 Triton X-100)이 빠르게 투과하지 않을 정도의 견고한 방어벽 기능을 가지고 있어야 한다. 방어벽 기능의 정도는 IC50 또는 ET50으로 나타내며 기준은 다음 표와 같다.

피부 모델	시험조건	범위
EpiSkin™(SM)	SDS로 18 시간 처리	1.0 ≤ IC50 ≤ 3.0 mg/mL
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	1 % Triton X-100 처리	4 ≤ ET50 ≤ 8.7 시간
SkinEthic™ RHE	1 % Triton X-100 처리	4 ≤ ET50 ≤ 10 시간
epiCS®	1 % Triton X-100 처리	2 ≤ ET50 ≤ 7 시간

**12-1-27. 피부부식성시험: 인체피부모델시험법 (RhE test) <신설 2018.12.1 7.>**

12-1-27-1. 시험농약 : 원제

12-1-27-2. 인체피부모델

12-1-27-2-1. 인체피부모델 종류: 국제적으로 적정성이 검증된 모델을 사용한다. 이외의 인체피부모델을 사용할 때에는 해당 인체피부모델에 대한 신뢰성, 정밀성, 제한점 등에 관한 품질 보증 및 검증 자료를 제출해야 한다.

12-1-27-2-2. 인체피부모델 조건: 인체피부모델을 제작하기 위해서는 비형질전환 케라틴 세포를 사용하여야 한다. 인체피부모델은 각질층(Stratum corneum) 아래에 다수의 표피 세포층 (Basal layer, stratum spinosum, stratum granulosum)이 존재하여야 한다. 또한 방어벽 기능을 가지며 미생물 등에 의해 오염이 되지 않아야 한다.

12-1-27-2-3. 인체피부모델 생존율: 생존율은 MTT법으로 측정하고 MTT 포르마잔 함량은 표준흡광도 측정이나 HPLC/UPLC-분광광도법 측정을 통해 정량한다. 음성대조군의 흡광도는 다음 표를 만족하여야 하며 MTT법에 사용되는 용매 흡광도는 0.1 미만으로 세포생존율의 측정을 방해하지 않아야 한다.

피부 모델	음성대조군 흡광도 범위
EpiSkin™(SM)	0.6 ≤ OD570nm ≤ 1.5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	0.8 ≤ OD570nm ≤ 2.8
SkinEthic™ RHE	0.8 ≤ OD570nm ≤ 3.0
epiCS®	0.8 ≤ OD570nm ≤ 2.8

12-1-27-2-4. 인체피부모델 방어벽 기능: 인체피부모델은 세포독성 지표물질 (SDS 또는 Triton X-100)이 빠르게 투과하지 않을 정도의 견고한 방어벽 기능을 가지고 있어야 한다. 방어벽 기능의 정도는 IC50 또는 ET50으로 나타내며 기준은 다음 표와 같다.

피부 모델	시험조건	범위
EpiSkin™(SM)	SDS로 18 시간 처리	1.0 ≤ IC50 ≤ 3.0 mg/mL
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	1 % Triton X-100 처리	4 ≤ ET50 ≤ 8.7 시간
SkinEthic™ RHE	1 % Triton X-100 처리	4 ≤ ET50 ≤ 10 시간
epiCS®	1 % Triton X-100 처리	2 ≤ ET50 ≤ 7 시간

12-1-27-2-5. 인체피부모델 품질관리: 인체피부모델 공급자가 제시하는 품질기준에 적합할 때에만 사용한다. 인체모델은 구조, 생존율, 방어벽 기능이 품질

기준에 적합하여야 하며, IC50 또는 ET50로 판단한다.

12-1-27-2-6. 재현성: 시험기관의 반복적인 실험에서 비부식성물질과 부식성물질의 결과가 재현성 있게 확인되어야 한다.

분류	화학물질명 (CAS No)
비부식성	Phenethyl bromide (103-63-9)
	4-Amino-1,2,4-triazole (584-13-4)
	4-(methylthio)-benzaldehyde (3446-89-7)
부식성 (구분 1A)	Lauric acid (143-07-7)
	Acrylic acid (79-10-7)
	Bromo acetic acid (79-08-3)
	Boron trifluoride dihydrate (13319-75-0)
부식성 (구분 1B, 1C)	Phenol (108-95-2)
	Glyoxylic acid monohydrate (563-96-2)
	Lactic acid (598-82-3)
	N,N-Dimethylbenzylamine (103-83-3)
	Sodium bisulfate monohydrate (10034-88-5)

12-1-27-3. 대조군: 양성대조군은 빙초산(Glacial acetic acid) 또는 8N 수산화칼륨(KOH)을 사용하며, 음성대조군은 0.9% 염화나트륨(NaCl) 또는 증류수를 사용한다.

12-1-27-4. 인체피부모델 전(前)배양: 시험물질을 투여하기 전에 일정시간동안 세포 배양기에서 전(前)배양하며, 각 모델 공급자의 방법에 따른다.

12-1-27-5. 시험물질 처리

12-1-27-5-1. 액체 및 고체 모두 적용이 가능하며 각 시험물질, 처리시간마다 최소 2 개의 인체피부를 사용한다.

12-1-27-5-2. 처리 방법은 인체피부모델 공급자의 방법에 따르며 인체피부모델 또는 시험물질의 성상에 따라 조금씩 차이가 있다.

12-1-27-5-3. 고체물질을 적용 시, 증류수 등을 피부 위에 도포하고 필요한 경우 시험 전에 분말로 분쇄하여 사용한다.

12-1-27-5-4. 시험물질 처리는 3분 처리와 60분 처리의 2개 처리군으로 나누어 시험한다. 단, EpiSkinTM은 추가로 240 분 처리군을 둔다.

12-1-27-6. 시험물질 세척

12-1-27-6-1. 시험물질 처리가 종료되면 피부모델을 인산완충액(PBS)이나 0.9% 염화나트륨(NaCl)으로 세척한다.

12-1-27-6-2. 시험물질 세척수의 양은 각 피부모델 공급자의 방법에 따른다.

모델 과정	EpiSkinTM (SM)	EpiDermTM SCT (EPI-200)	SkinEthic RHETM	epiCS®
물질 처리				
액체 (μL)	50 (131.6 μL/cm <sup>2</sup> )	50 (79.4 μL/cm <sup>2</sup> )	40 (80 μL/cm <sup>2</sup> )	50 (83.3 μL/cm <sup>2</sup> )
고체 (mg)	20 (52.6 mg/cm <sup>2</sup> ) + NaCl 용액 (100 μL)	25 (39.7 mg/cm <sup>2</sup> ) + 증류수 (25 μL)	20 (40 mg/cm <sup>2</sup> ) + 증류수 (20 μL)	25 (41.7 mg/cm <sup>2</sup> ) + 증류수 (25 μL)
나일론 망	필요 시 사용	필요 시 사용	사용	사용
처리시간 (min)	3, 60, 240	3, 60	3, 60	3, 60
배양 온도	실온	-3분 처리군 : 실온 -60분 처리군: 37 °C, 5% CO <sub>2</sub>		

### 12-1-27-7. 세포생존율 측정

12-1-27-7-1. 인체모델에 적절한 농도 (예, 0.3~1 mg/mL)의 MTT용액을 넣고 3시간 동안 CO<sub>2</sub> 세포 배양기에서 배양한다. 침전된 청색의 포르마잔 산물을 이소프로판올(Isopropanol)로 추출하여 표준흡광도(570nm) 측정이 나 HPLC/UPLC-분광광도법 측정을 통해 정량한다.

12-1-27-7-2. 시험물질이 MTT와 직접 작용하여 흡광도 측정에 영향을 줄 경우, 시험물질에 의한 방해로 보정하기 위하여 추가적인 대조군을 사용한다.

12-1-27-7-3. 세포생존율은 음성대조군의 흡광도에 대한 시험물질 처리군의 흡광도 백분율로 구한다. HPLC/UPLC-분광광도법을 이용 시에는 음성대조군의 포르마잔 peak area에 대한 시험물질의 포르마잔 peak area 백분율로 구한다. 단, HPLC/UPLC-분광광도법 이용 시에는 국제적 수용기준 (acceptance criteria) 충족 여부를 확인하여 시스템에 대한 사전검증이 이루어져야 한다.

12-1-27-8. 결과 판정: 산출된 세포생존율에 따라 각 인체피부모델별 판정기준에 의해 부식성 또는 비부식성을 판정한다.

### 12-1-27-9. 시험의 적정성

12-1-27-9-1. 음성대조군의 흡광도 범위와 양성대조군의 세포생존율 기준에 적합해야 한다. 각 동일조건으로 처리된 인체피부모델간의 결과 값이 30 % 이상 차이가 나지 않아야 된다.

	EpiSkin™ (SM)	EpiDerm™ SCT(EPI-200)	SkinEthic RHETM	epiCS®
양성대조 물질	빙초산	8N KOH	8N KOH	8N KOH
처리시간 (hr)	4	1	1	1
양성대조 물질 세포 생존율 (%)	20 % 이하	15 % 미만	15 % 미만	20 % 미만

12-1-27-9-2. 2반복의 시험 결과가 서로 일치하지 않거나 평균값이 판정기준 경계에 존재할 경우에는 두 번째 시험을 수행한다. 앞선 두 번의 결과가 일치하지 않으면 세 번째 시험을 수행한다.

### 12-1-28. 피부자극성시험: 인체피부모델시험법 (RhE test) <신설 2018.12.1 7.>

12-1-28-1. 시험농약 : 원제

12-1-28-2. 인체피부모델

12-1-28-2-1. 인체피부모델 종류: 피부부식성시험(인체피부모델시험법)에 준함.

12-1-28-2-2. 인체피부모델 조건: 피부부식성시험(인체피부모델시험법)에 준함.

12-1-28-2-3. 인체피부모델 생존율: 피부부식성시험(인체피부모델시험법)에 준함.

피부 모델	음성대조군 흡광도 범위
EpiSkin™(SM)	$0.6 \leq OD_{570nm} \leq 1.5$
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	$0.8 \leq OD_{570nm} \leq 2.8$
SkinEthic-200 RHE	$0.8 \leq OD_{570nm} \leq 3.0$
LabCyte EPI-MODEL 24 SIT	$0.7 \leq OD_{570nm} \leq 2.5$

12-1-28-2-4. 인체피부모델 방어벽 기능: 피부부식성시험(인체피부모델시험법)에 준함.

피부 모델	시험조건	범위
EpiSkin™ (SM)	SDS로 18 시간 처리	$1.0 \leq IC_{50} \leq 3.0$ mg/mL
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	1 % Triton X-100 처리	$4 \leq ET_{50} \leq 8.7$ 시간
SkinEthic-200 RHE	1 % Triton X-100 처리	$4 \leq ET_{50} \leq 10$ 시간
LabCyte EPI-MODEL 24 SIT	SDS로 18 시간 처리	$1.4 \leq IC_{50} \leq 4.0$ mg/mL

12-1-28-2-5. 인체피부모델 품질관리: 피부부식성시험(인체피부모델시험법)에 준함.

12-1-28-2-6. 재현성: 시험기관의 반복적인 실험에서 비자극성물질과 자극성물질의 결과가 재현성 있게 확인되어야 한다.

분류	화학물질명 (CAS No)
비자극성 물질	Naphthalene acetic acid (86-87-3)
	Isopropanol (67-63-0)
	Methyl stearate (112-61-8)
	Heptyl Butyrate (5870-93-9)
	Hexyl salicylate (6259-76-3)
자극성 물질 (구분 2)	Cyclamen aldehyde (103-95-7)
	1-bromohexane (111-25-1)
	Potassium hydroxide (5% 수용액) (1310-58-3)
	1-methyl-3-phenyl-1-piperazine (5271-27-2)
	Heptanal (111-71-7)

12-1-28-3. 대조군: 양성대조군은 5 % Sodium dodecyl sulfate (SDS), 음성대조군은 멸균수 또는 인산완충용액 (Phosphate buffered saline, PBS)을 사용한다.

12-1-28-4. 인체피부모델 전(前)배양: 피부부식성시험(인체피부모델시험법)에 준함.

12-1-28-5. 시험물질 처리

12-1-28-5-1. 액체 및 고체 모두 적용이 가능하며, 시험물질마다 최소 3 개의 인체피부를 사용한다.

12-1-28-5-2. 처리 방법은 인체피부모델 공급자의 방법에 따르며 인체피부모델 또는 시험물질의 성상에 따라 조금씩 차이가 있다.

12-1-28-5-3. 고체물질을 적용 시, 멸균증류수 등을 피부 위에 도포하고 필요한 경우 시험 전에 분말로 분쇄하여 사용한다.

12-1-28-6. 시험물질 세척: 피부부식성시험(인체피부모델시험법)에 준함.

12-1-28-7. 인체피부모델 후(後)배양: 세포가 시험물질에 의한 손상으로부터 회복되는 것을 평가하기 위해 세척 후에는 시험물질을 투여하지 않은 상태에서 42 시간 동안 후(後)배양한다.

모델 과정	EpiSkinTM (SM)	EpiDermTM SIT (EPI-200)	SkinEthic RHETM	LabCyte EPI -MODEL24 SIT
A) 전배양				
배양 조건	배지 2mL, 18-24 시간	배지 0.9mL, 18-24 시간	배지 0.3 또는 1mL, 2 시간 이상	배지 0.5mL, 15-30 시간
B) 물질 처리				

액체 (μL)	10 (26 μL/cm <sup>2</sup> )	30 (47 μL/cm <sup>2</sup> )	16 (32 μL/cm <sup>2</sup> )	25 (83 μL/cm <sup>2</sup> )
고체 (mg)	10 (26 mg/cm <sup>2</sup> ) + DW (5 μL)	25 (39 mg/cm <sup>2</sup> ) + DPBS (25 μL)	16 (32 mg/cm <sup>2</sup> ) + DW (10 μL)	25 (83 mg/cm <sup>2</sup> ) + DW (25 μL)
나일론 망	사용하지 않음	필요 시 사용	사용	사용하지 않음
처리시간 (min)	15	60	42	15
배양 조건	실온	37 °C, 35 분 배양 후 실온, 25 분	실온	실온
C) 후배양				
배양시간 (hr)	42	42	42	42
배지량 (mL)	2	0.9 mL, 24시간 후 0.9 mL 배지 교환	2	1

\* DW : 증류수, DPBS : Dulbecco's PBS

12-1-28-8. 세포생존율 측정: 후배양이 끝난 후, 피부부식성시험(인체피부모델시험법)에 준하여 세포생존율을 측정한다.

12-1-28-9. 결과 판정: 세포생존율이 50% 이하일 때 자극성(구분 2), 50% 보다 클 때 비자극성으로 판정한다.

12-1-28-10. 시험의 적정성

12-1-28-10-1. 음성대조군의 흡광도 범위가 각 인체피부모델의 기준에 적합해야 하며 양성대조군에서 자극성이 확인되어야 한다. 각 동일조건으로 시험물질이 처리된 피부모델간의 표준편차는 18 이하여야 한다.

12-1-28-10-2. 3반복의 시험 결과가 서로 일치하지 않거나 평균값이 50±5 %의 범위에 존재할 경우에는 두 번째 시험을 수행한다. 앞선 두 번의 결과가 일치하지 않으면 세 번째 시험을 수행한다.

## 12-1-29. 안점막자극성시험: 인체각막유사상피모델시험법(RhCE test) <신설 2018.12.17.>

12-1-29-1. 시험농약 : 원제

12-1-29-2. 인체각막유사상피모델

12-1-29-2-1. 인체각막유사상피모델 종류: 국제적으로 적정성이 검증된 모델을 사용한다. 이외의 인체각막상피모델을 사용할 때에는 해당 모델에 대한 신뢰성, 정밀성, 제한점 등에 관한 품질 보증 및 검증 자료를 제출해야 한다.

12-1-29-2-2. 인체각막유사상피모델 조건: 인체각막유사상피모델은 살아 있고 다층의 상피세포 구조로 존재해야 한다. 또한 방어벽 기능을 가지며 미생물 등에 의해 오염이 되지 않아야 한다.

12-1-29-2-3. 인체각막유사상피모델 생존율: 피부부식성시험(인체피부모델시험법)에 준함.

각막유사상피 모델	음성대조군 흡광도 범위
EpiOcular™ EIT	0.8 < OD570nm < 2.5
SklinEthic™ HCE EIT	1.0 < OD570nm ≤ 2.5

12-1-29-2-4. 인체각막유사상피모델 방어벽 기능: 피부부식성시험(인체피부모델시험법)에 준함.

각막유사상피 모델	시험조건	범위
EpiOcular™ EIT	0.3 % Triton X-100 처리	12.2 ≤ ET50 ≤ 37.5분
SklinEthic™ HCE EIT	SDS 처리	1 ≤ IC50 ≤ 3.2 mg/ml

12-1-29-2-5. 인체각막유사상피모델 품질관리: 피부부식성시험(인체피부모델시험법)에 준함.

12-1-29-2-6. 재현성: 피부부식성시험(인체피부모델시험법)에 준함.

분류	화학물질명 (CAS No)
비자극성	1-Ethyl-3-methylimidazolium ethylsulphate (342573-75-5)
	Dipropyl disulphide (629-19-6)
	Piperonyl butoxide (51-03-6)
	Polyethylene glycol (PEG-40) hydrogenated cateor oli (61788-85-0)
	1-(4-Chlorophenyl)-3-(3,4-dichlorophenyl) urea (101-20-2)
	2,2'-Methylene-bis-(6-(2H-benzotriazol-2-yl)-4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenol) (103597-45-1)
	Potassium tetrafluoroborate (14075-53-7)
자극성 (2A, 2B)	2,4,11,13-Tetraazatetradecane-diimidamide, N,N"-bis(4-chlorophenyl-3,12-diimino-di-D-gluconate (20% 수용액) (18472-51-0)
	1,5-Naphthalenediol (83-56-7)
	Diethyl toluamide (134-62-3)
	2,2-Dimethyl-3-methylenebicyclo[2,2,1] heptane (79-92-5)
부식성 (1)	Methylthioglycolate (2365-48-2)
	Tetraethylene glycol diacrylate (17831-71-9)
	2,5-Dimethyl-2,5-hexanediol (110-03-2)
	Sodium oxalate (62-76-0)

12-1-29-3. 대조군: 양성대조군은 메칠아세테이트(Methyl acetate) 원액, 음성대조군은 멸균수 또는 Ca<sup>2+</sup>/ Mg<sup>2+</sup> 함유하지 않은 인산완충액(DPBS)을 사용한다.

12-1-29-4. 인체각막유사상피 모델 전(前)배양: 피부부식성시험(인체피부모델시험법)에 준함.

12-1-29-5. 시험물질 처리

12-1-29-5-1. 액체 및 고체 모두 적용이 가능하며, 시험물질마다 최소 2 개의 인체각막유사상피를 사용한다.

12-1-29-5-2. 처리 방법은 인체각막유사상피모델 공급자의 방법에 따르며 인체 각막유사상피모델 또는 시험물질의 성상에 따라 조금씩 차이가 있다.

모델 과정	EpiOcular™ EIT		SkinEthic™ HCE EIT	
	고체	액체	고체	액체
A) 전 처리				
처리 조건	Ca <sup>2+</sup> / Mg <sup>2+</sup> 함유하지 않은 DPBS 20 µL, 37 °C, 5 % CO <sub>2</sub> , 30±2 분		Ca <sup>2+</sup> / Mg <sup>2+</sup> 함유하지 않은 DPBS 30 µL	Ca <sup>2+</sup> / Mg <sup>2+</sup> 함유하지 않은 DPBS 10 µL
B) 물질 처리				
처리 양	50 mg (83.3 mg/cm <sup>2</sup> )	50 µL (83.3 µL/cm <sup>2</sup> )	30 mg (60 mg/cm <sup>2</sup> )	30 µL (60 µL/cm <sup>2</sup> )
노출 시간	6±0.25 시간	30±2 분	4±0.1 시간	30±2 분
배양 조건	37 °C, 5 % CO <sub>2</sub>			
C) 세척 후 침지				
침지 조건	25±2 분, 상온, 새 배지	12±2 분, 상온, 새 배지	30±2 분, 상온, 새 배지	30±2 분, 37 °C, 5 % CO <sub>2</sub> , 새 배지
D) 후배양				
배양 조건	120±15 분, 37°C, 5 % CO <sub>2</sub>	120±15 분, 37°C, 5 % CO <sub>2</sub>	18±0.5 시간, 37°C, 5 % CO <sub>2</sub>	-

12-1-29-6. 시험물질 세척

12-1-29-6-1. 시험물질 처리가 종료되면 인체각막유사상피 모델을 DPBS로 세척한다.

12-1-29-6-2. 시험물질 세척수의 양은 인체각막유사상피 모델 생산자의 방법에 따른다.

12-1-29-7. 인체각막유사상피모델 후(後)배양: 세포가 시험물질에 의한 손상으로부터 회복되는 것을 평가하고 확실한 세포독성이 나타나도록 인체각막유사상피 모델 생산자의 방법에 따라 후배양한다.

12-1-29-8. 세포생존율 측정: 피부부식성시험(인체피부모델시험법)에 준함.

12-1-29-9. 결과 판정: 산출된 세포생존율에 따라 각 인체각막유사상피모델별 판정기준에 의해 비자극성, 자극성/부식성을 판정한다.

12-1-29-10. 시험의 적정성

12-1-29-10-1. 음성대조군의 흡광도 범위가 기준에 적합해야 한다. 양성대조군 처리 시 세포생존율은 다음 표와 같아야 한다.

	양성대조물질 처리군의 세포생존율 (%)	
	고체	액체
EpiOcular™ EIT	50% 미만	50% 미만
SkinEthic™ HCE EIT	20% 이하	30% 이하

12-1-29-10-2. 각 동일조건으로 시험물질이 노출된 각막상피유사모델간의 생존율 차이는 2개 조직 이용 시 20%보다 작아야 하며, 3개 조직 이용 시 표준편차 18%를 초과해서는 안 된다.

12-1-29-10-3. 2개의 각막 상피 모델 결과가 일치하지 않거나 평균 세포생존율이 60±5 % (EpiOcular: 액체 및 고체, SkinEthic HCE: 액체) 또는 50±5 % (SkinEthic HCE: 고체)를 보이는 경우, 추가 시험을 수행해야 한다.

### 12-1-30. 포유류세포를 이용한 체외 소핵시험 <신설 2018.12.17.>

12-1-30-1. 시험농약 : 원제

12-1-30-2. CHO, V79, CHL/IU 세포와 같은 설치류 세포주 혹은 TK6와 같은 인체 세포주를 사용한다.

12-1-30-3. 대사활성화 체계 및 세포질분열 억제제 사용

12-1-30-3-1. 내인성 대사 능력이 적절하지 못한 세포를 사용할 경우 외인성 대사활성화 체계를 사용하며, 세포질분열 억제제로 cytochalasin B(cytoB)를 사용한다.

12-1-30-4. 시험물질 처리

12-1-30-4-1. 최소 3가지 농도를 처리하며, 시험된 각각의 농도에서 반복 또는 단일 배양이 사용될 수 있다.

12-1-30-4-2. 일반적으로, 다음 세 가지 시험조건의 시험을 수행한다.

시험 조건	
조건 1	3~6 시간 동안 대사활성화 체계 없이 세포에 시험물질을 처리하고, 처리 시작 후 약 1.5~2.0 정상 세포주기 길이에 해당하는 시간에 시료를 채취
조건2	3~6 시간 동안 대사활성화 체계와 함께 세포에 시험물질을 처리하고, 처리시작 후 약 1.5~2.0 정상 세포주기 길이에 해당하는 시간에 시료를 채취
조건 3	약 1.5~2.0 정상 세포주기 길이에 해당하는 시간 동안 대사활성화 없이 지속적으로 시험물질을 처리하고, 시료를 채취

12-1-30-5. 대조군 설정 : 모든 시험에는 양성과 음성대조군을 포함하도록 하며, 시험조건에 따라 이수성유발물질(aneugen) 및 염색체절단물질(clastogen) 규명에 적합한지 확인하기 위해 다음의 양성대조물질을 사용할 수 있다.

범주	물질	CAS 번호
1. 대사적 활성이 요구되지 않는 염색체절단물질	Methyl methanesulphonate	66-27-3
	Mitomycin C	50-07-7
	4-Nitroquinoline-N-Oxide	56-57-5
	Cytosine arabinoside	147-94-4
2. 대사적 활성이 요구되는 염색체절단물질	Benzo(a)pyrene	50-32-8
	Cyclophosphamide	50-18-0
3. 이수성유발물질	Colchicine	64-86-8
	Vinblastine	143-67-9

12-1-30-6. 소핵 계수 : Cyto B가 사용 될 경우, 농도 및 대조군 당 최소 500 개의 세포를 사용하여 소핵을 계수하며, Cyto B가 부재한 시험의 경우 최소 2,000 개의 이핵세포에서 소핵 빈도를 분석한다.

12-1-30-6. 결과 판정 : Cyto B 처리와 미처리시 모두 세포성장억제율 (Cytostasis)로 세포독성을 평가하며, Cyto B 미처리한 경우 증식지수(PI; Proliferation index)로도 평가할 수 있다.

12-1-30-6-1. CytoB 처리 시 세포질분열 억제 증식 지표(Cytokinesis-Block Proliferation Index; CBPI) 또는 복제지수(Replicative Index; RI)를 기반으로 산출한다.

$$1) \text{ CBPI} = \frac{((\text{단핵세포수}) + (2 \times \text{이핵세포수}) + (3 \times \text{다핵세포수}))}{(\text{전체세포수})} \times 100$$

$$2) \text{ RI} = \frac{((\text{단핵세포수}) + (2 \times \text{이핵세포수}) + (3 \times \text{다핵세포수}))_{\text{시험물질}}}{(\text{전체세포수})_{\text{대조물질}}} \times 100$$

$$3) \text{ Cytostasis} = 100 - 100(\text{CBPI}_{\text{시험물질}} - 1) \div (\text{CBPI}_{\text{대조물질}} - 1) \text{ (또는 } 100 - \text{RI)}$$

12-1-30-6-2. CytoB 미처리 시, 상대적 세포 수 증가(Relative Increase in Cell Count; RICC) 또는 상대적 집단 배가(Relative Population Doubling; RPD)를 기반으로 산출한다.

$$1) \text{FIIC} = \frac{(\text{시험물질 처리구 배양에서 세포수의 증가(최종 시점})}{(\text{대조물질 처리구 배양에서 세포수의 증가(최종 시점})} \times 100$$

$$2) \text{FPD} = \frac{(\text{시험물질 처리구 배양에서 집단배가수})}{(\text{대조물질 처리구 배양에서 집단배가수})} \times 100$$

$$3) \text{Cytotoxicity} = 100 - \text{FIIC} \text{ (또는 } 100 - \text{FPD)}$$

$$4) \text{집단배가(Population Doubling)} = [\log(\text{처리 후 세포 수} \div \text{초기 세포 수})] \div \log 2$$

$$5) \text{PI} = \frac{((1 \times \text{1개 세포 증식 수}) + (2 \times \text{2개 세포 증식 수}) + (3 \times \text{3개 세포 증식 수}) + (4 \times \text{4개 세포 증식 수}))}{1 \times \text{1개 세포 증식 수} + 2 \times \text{2개 세포 증식 수} + 3 \times \text{3개 세포 증식 수} + 4 \times \text{4개 세포 증식 수}}$$

12-1-31. in chemico 피부감작성시험: 펩타이드 반응성 시험법 (Direct peptide reactivity assay, DPRA) <신설 2019.3.21.>

12-1-31-1. 시험농약: 원제

12-1-31-2. 용매 선정: 시험물질을 완전히 녹일 수 있는 용매로 선정해야 한다. 아세토나이트릴 (acetonitrile), 물, 물:아세토나이트릴(1:1), 이소프로판올 (isopropanol), 아세톤(acetone), 아세톤:아세토나이트릴(1:1) 등이 용매로 사용될 수 있다. 시험물질이 이들 용매 중에서 녹지 않는다면, 시험물질을 300  $\mu\text{l}$  DMSO에 녹인 다음 2700  $\mu\text{l}$  아세토나이트릴을 넣어 희석하여 사용한다. 이에도 용해되지 않으면 시험물질을 1500  $\mu\text{l}$  DMSO에 녹인 다음 1500  $\mu\text{l}$  아세토나이트릴을 넣어 희석하여 사용한다.

12-1-31-3. 시험물질 준비: 용매를 이용하여 최종 농도가 100 mM가 되도록 준비하나, 이 농도에서 녹지 않는 시험물질인 경우 녹을 수 있는 농도에서 시험할 수 있다. 단 100 mM 미만의 농도를 이용하여 시험한 경우, 양성 결과만 이용할 수 있다. 4 mL의 바이알(vial)에 100 mM의 농도로 3 mL 시험물질을 제조한다.

12-1-31-4. 시스테인(Cysteine) 또는 리신(Lysine) 함유 펩타이드(peptide) 제조: 순도 85% 이상의 시스테인(Ac-RFAACAA-COOH) 또는 리신(Ac-RFAAKAA-COOH) 함유 펩타이드 용액을 시험물질과 반응시키기 바로 전에 조제한다.

12-1-31-4-1. 시스테인 펩타이드는 인산 완충액(phosphate buffer, pH 7.5)에 녹여 최종 농도가 0.667 mM가 되도록 원액(stock)을 제조한다.

- 12-1-31-4-2. 리신 펩타이드는 암모늄아세테이트 완충액(Ammonium acetate buffer, pH 10.2)에 녹여 최종 농도가 0.667 mM가 되도록 stock을 제조한다.
- 12-1-31-4-3. 동일한 분석 시험에 사용하는 시료는 동일한 시스테인 또는 리신 펩타이드 용액을 사용하여야 한다.
- 12-1-31-5. 대조군
- 12-1-31-5-1. 양성대조물질로 100 mM cinnamic aldehyde (CAS 104-55-2)을 사용하며, 이때 아세토나이트릴을 용매로 한다.
- 12-1-31-5-2. 3가지 유형(A, B, C)의 참고대조물질 (Reference controls, 각 적당한 용매에 펩타이드 만을 혼합한 시료)을 HPLC 분석에 포함해야 한다.
- 12-1-31-5-2-1. 참고대조물질 A는 HPLC 시스템의 적합성을 확인하기 위해 아세토나이트릴을 사용한다.
- 12-1-31-5-2-2. 참고대조물질 B는 시간 경과에 따른 안정성을 확인하기 위해 아세토나이트릴을 사용하며 처음과 마지막에 injection 된다.
- 12-1-31-5-2-3. 참고대조물질 C는 사용된 용매가 펩타이드 소실율에 영향을 주지 않는다는 것을 확인하기 위해 각 사용된 용매를 이용한다.
- 12-1-31-5-3. 시험물질로만 구성된 동시용출대조군(co-elution control)을 포함하여 시스테인 또는 리신 펩타이드와 함께 시험물질이 동시에 용출될 가능성을 확인해야 한다.
- 12-1-31-6. 시험물질과 펩타이드 용액의 반응: 시험물질과 시스테인 또는 리신 펩타이드 용액을 반응시킨다. 시스테인 펩타이드 용액은 시험물질과 1:10, 리신 펩타이드 용액은 시험물질과 1:50의 비율로 반응시킨다.
- 12-1-31-6-1.  $25 \pm 2.5$  °C 암실에서  $24 \pm 2$  시간동안 반응시킨 후 HPLC로 분석한다. 시험물질은 두 펩타이드에 대하여 각각 3회 반복 분석한다.
- 12-1-31-6-2. 반응액에서 침전물이나 상 분리가 관찰되면 필요시 원심분리 (100~400 g)를 통해 침전물을 가라앉힌다. 침전물이나 상 분리가 일어나면 결과 판정에 유의해야한다.
- 12-1-31-7. 시스테인과 리신 펩타이드에 대한 표준검량곡선을 작성한다. 펩타이드 표준액은 20 % 또는 25 % 아세토나이트릴:완충액(인산 완충액 또는 암모늄아세테이트 완충액)을 사용하여 제조한다.
- 12-1-31-7-1. 펩타이드 원액 (0.667 mM)을 연속적으로 희석하여 0.534~0.0167 mM 범위의 6 농도 표준액을 제조한다.
- 12-1-31-7-2. 희석용매의 공시험액(blank)을 표준검량곡선에 포함시켜야 한다.

12-1-31-7-3. 표준검량곡선의 r2 값은 0.99를 초과하여야 한다.

12-1-31-8. HPLC 분석: HPLC-UV 검출기를 이용하며, HPLC 분석을 수행하기 전에 HPLC 적합성을 증명해야 한다. 시험물질과 펩타이드 혼합 후 22 시간에서 26 시간 사이에 첫 번째 시료가 주입(injection)되도록 한다. 마지막 주입이 시험물질과 펩타이드 혼합 후 30시간 이내가 되도록 한다.

12-1-31-8-1. 분석하기 전 최소 2시간 전에 적절한 이동상을 흘려주면서 HPLC 시스템을 평형상태로 만든다.

12-1-31-8-2. 0.35 ml/min 유속으로 10분 동안 아세토니트릴을 10 %에서 25 % 까지 직선 구배로 증가시키고, 이후 농도를 90 %까지 급속하게 증가시켜 다른 물질들을 제거한다.

12-1-31-8-3. 표준물질, 시험물질, 대조군을 동일한 용량으로 주입한다. 시료를 주입하기 전에 컬럼을 재평형 시킨다. 다른 종류의 역상 HPLC 컬럼을 사용하는 경우, 주입량 등 설정 조건을 조정하며, 다른 HPLC 분석조건을 이용한다면 국제적으로 검증된 HPLC 분석조건과 동등하다는 것을 증명하여야 한다.

12-1-31-8-4. UV 검출기를 이용하여 220 nm에서 흡광도를 측정한다. 광다이오드 배열 검출기 이용 시에는 258 nm에서도 측정한다.

12-1-31-9. 피크(peak) 면적(AUC)을 이용하여 펩타이드 소실율을 산출한다.

$$\left(1 - \frac{\text{시험물질의 펩타이드 피크면적}}{\text{참고대조물질 C의 펩타이드 피크면적 평균}}\right) \times 100$$

12-1-31-10. HPLC 분석, 시험결과와 적정성 기준을 충족해야 한다.

## 12-1-32. in vitro 피부감작성시험: ARE-Nrf2 루시퍼라제 시험법 (ARE-Nrf2 Luciferase test)

12-1-32-1. 시험농약: 원제

12-1-32-2. 세포주 종류: KeratinoSens™ 등과 같이 국제적(OECD)으로 검증된 세포를 사용한다.

12-1-32-3. 세포 관리 및 배양

12-1-32-3-1. KeratinoSens™ 세포주를 수령하자마자 증식시켜(2~4세대) 동결보관한다. 동결보관 세포주에 대해서는 최대 25 세대까지 증식시켜 사용할 수 있다.

12-1-32-3-2. 시험 전날에 96-well plate에 well 당 10,000개 세포 밀도로 배양한다.

#### 12-1-32-4. 물질 준비

12-1-32-4-1. KeratinoSens™ 시험법에서는 용매대조군으로 DMSO를 사용하고 최종 농도는 1%가 되도록 한다. 음성대조군으로 용매대조군인 DMSO가 사용될 수 있다.

12-1-32-4-2. KeratinoSens™ 시험법에서는 양성대조물질로는 시나믹 알데하이드(cinnamic aldehyde)를 사용한다. DMSO를 용매로 하여 6.4 mM 원액을 만들고 희석하여 최종 농도가 4 ~ 64 uM가 되게 준비한다.

12-1-32-4-3. 시험물질은 시험 당일 DMSO에 용해시킨다. DMSO에 녹지 않는 물질은 멸균수 또는 배양배지에 녹이되 여과하여 멸균한다. 시험물질은 200 mM 농도로 제조한 후 단계별 희석하여 0.098 ~ 200 mM까지 12개의 마스터(master) 농도로 준비한다. 사용한 용매에 상관없이, 혈청을 함유한 배양배지로 마스터 농도를 25배 더 희석한다. 시험물질 처리 시에는 well에서 최종적으로 4배 추가 희석되어 시험물질의 최종농도가 0.98 ~ 2000 uM되도록 한다.

12-1-32-4-4. 분자량을 알 수 없는 시험물질의 경우 KeratinoSens™ 시험법에서는 40 mg/ml 또는 4 % (w/v) 농도로 제조한다. DMSO 등 용매를 이용하여 단계별 희석해 최종 농도를 KeratinoSens™ 시험법에서는 0.196 ~ 400 ug/ml로 준비한다.

#### 12-1-32-5. 물질 처리

12-1-32-5-1. 양성대조물질과 시험물질은 최소 두 번의 반복시험을 하며, 각 시험에서 3개의 well에 물질을 처리한다(n=6). 2번의 반복시험이 일치하지 않으면 3번째 반복시험을 해야 한다. 각 반복시험은 새로 준비한 시험물질 용액을 사용하고, 서로 다른 날짜에 배양된 세포를 이용한다. 같은 계대수의 세포를 이용하는 것은 가능하다.

12-1-32-5-2. 24시간 동안 배양한 세포에서 배지를 제거하고 신선한 배양배지 150 ul와 25배 희석된 시험물질(well에서의 최종농도 0.98 ~ 2000 uM) 또는 대조물질이 첨가된 50 ul 배양배지를 넣어준다. plate 당 최소 하나의 well은 Background 값을 평가하기 위해 아무것도 넣지 않는다. 물질이 처리된 plate를 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 배양기에서 약 48시간 동안 배양한다.

12-1-32-6. 루시퍼라아제 활성 측정: 48시간 노출 후, 인산완충생리식염수(PBS)로 세척한다. 세포 용해 완충액(lysis buffer)을 첨가한 후 KeratinoSens™ 시험법에서는 실온에서 20분 정도 반응시킨다. 기질을 추가한 후 발광측정기

(luminometer)를 이용하여 루시페라아제 활성을 측정한다.

12-1-32-7. 세포 독성 측정: 시험물질 48시간 노출 후, 시험 물질이 함유된 배지를 제거한다. MTT 함유 배지로 갈아주고 세포 배양조건에서 배양한다.

12-1-32-7-1. KeratinoSens™ 시험법에서는 5 mg/ml MTT 함유 배지로 갈아주고 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 배양기에서 4시간 배양한다. MTT 함유 배지를 제거하고 각 well에 10% SDS 용액을 추가하여 세포를 하루 동안(overnight) 용해한다. 진탕(shaking) 후 600 nm에서 흡광도를 측정한다.

12-1-32-8. 결과 산출 : KeratinoSens™ 시험법에서는 I<sub>max</sub> (루시페라아제 활성 유도 배수 평균 최댓값), EC<sub>1.5</sub> (루시페라아제 활성이 음성대조군보다 1.5 배 증가하는 시험물질의 농도), IC<sub>50</sub>과 IC<sub>30</sub>(세포생존율을 50%와 30%를 감소시키는 시험물질 농도)를 산출한다.

12-1-32-9. 시험의 적정성: 시험법에 따른 적정성 요건을 충족시켜야 한다.

### 12-1-33. in vitro 피부감작성시험: 인체세포주 활성화법(Human cell line activation test, h-CLAT)

12-1-33-1. 시험농약: 원제

12-1-33-2. 세포주 종류: 국제적(OECD)으로 적정성이 검증된 세포를 사용한다.<개정 2020.12.10.>

시험법	세포주
h-CLAT	THP-1 (ATCC TIB-202™)
U-SENS™	U937 (ATCC CRL1593.2™)
IL-8 Luc assay	THP-G8 (GPC lab)

12-1-33-3. h-CLAT

12-1-33-3-1. THP-1 세포 관리 및 배양

12-1-33-3-1-1. THP-1 세포는 해동 후 최대 2개월까지 계대배양이 가능하며 계대 수가 30을 초과해서는 안된다.

12-1-33-3-1-2. THP-1 세포의 반응성을 확인 후 적합한 세포만 시험에 사용한다. 양성대조군인 DNCB (2,4-dinitrochlorobenzene), 황산니켈(NiSO<sub>4</sub>)과 음성대조군인 젖산(Lactic acid)을 이용하여 세포와의 반응성을 확인한다. DNCB와 황산니켈은 세포 표면 표지자(CD 86, CD 54)에 대해 모두 양성반응을 보이고, 젖산은 세포 표면 표지자에 모두 음성 반응을 보여야 한다.

12-1-33-3-1-3. 배양 플라스크에 THP-1 세포 0.1×10<sup>6</sup> cells/ml 또는 0.2×10<sup>6</sup>

cells/ml 밀도로 각각 72시간 또는 48시간 동안 배양한다. 시험 당일, 배양 플라스크에서 획득한 THP-1 세포는  $2 \times 10^6$  cells/ml의 농도로 새로운 배양배지에 재현탁하고, 24 well plate에 well 당 500 ul ( $1 \times 10^6$  cells/well) 또는 96 well plate에 well 당 80 ul ( $1.6 \times 10^5$  cells/well)로 분주한다.

12-1-33-3-2. 용량설정 시험: 용매 대조군과 비교하여 75% 세포 생존율(CV75) 보이는 시험물질 농도를 구하기 위해 수행된다.

12-1-33-3-2-1. 시험물질 100 mg/ml(용매 : 생리식염수 또는 배지) 또는 500 mg/ml (용매 : DMSO)의 표준 원액(Stock)을 만들고 이후 희석하여 사용한다.

12-1-33-3-2-2. 생리식염수나 배지를 용매로 사용한 경우, 2배 연속 희석하여 8개의 표준원액을 조제한다. 8개의 표준원액을 배지에 각각 50배 희석한다. 최고농도인 1000 ug/ml이 무독성 일 때, 세포독성시험을 다시 실시하여 최대 농도를 재결정해야 한다. plate 내에서 최종 농도는 5000 ug/ml을 초과해서는 안된다.

12-1-33-3-2-3. DMSO를 용매로 사용한 경우, 2배 연속 희석하여 8개의 표준원액 (8가지 농도)를 조제한다. 8개의 표준원액을 배지에 250배 희석한다. plate 내에서 최종 농도는 1000 ug/ml을 초과해서는 안된다.

12-1-33-3-2-4. 용매 대조군은 배지 또는 0.2% DMSO를 사용한다.

12-1-33-3-2-5. 물질 처리: 24 well 또는 96 well plate에 준비된 세포 현탁액과 동등한 양으로 시험용액을 혼합한다(1:1 v/v). 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 배양기에서 약 24시간 동안 배양한다.

12-1-33-3-2-6. PI (Propidium Iodide) 염색: 시험물질 24 시간 노출 후, 원심 분리하여 상층액을 분리하여 버린다. 96-well plate의 경우, 남아있는 세포를 0.1% 소혈청알부민 함유 PBS(염색 완충액) 200 ul로 재현탁한다. 24-well plate의 경우 600 ul로 재현탁한다. 96-well plate에서 200 ul 세포현탁액 또는 24-well plate에서 600 ul 세포 현탁액을 취해 각각 96-well plate 또는 마이크로튜브에 옮겨 200 ul 또는 600 ul 염색완충액으로 두 번 세척한다. 세포는 염색완충액으로 재현탁하고 PI용액 (최종농도 0.625 ug/ml)을 첨가한다.

12-1-33-3-2-7. 세포독성 측정: 유세포 분석 및 CV75 값을 산출하여 세포독성을 측정한다. PI 흡수는 유세포 분석기의 획득 채널(acquisition channel) FL-3을 이용하여 분석된다. 총 10,000개의 살아있는 세포를 획득하며, 다음의 식을 이용하여 세포생존율을 산출한다. 세포생존율이 낮을 경우, 죽은 세

포를 포함하여 최대 30,000개의 세포를 획득한다. 75%의 THP-1세포 생존율을 나타내는 농도인 CV75 값(25% 세포독성)을 산출한다.

$$\text{세포생존율} = \frac{\text{살아있는세포수}}{\text{총획득한세포수}} \times 100$$

$$\text{LogCV75} = \frac{(75-c) \times \text{Log}(b) - (75-a) \times \text{Log}(d)}{a-c}$$

a: 75% 이상 세포생존율의 최솟값  
b: 75% 이상 세포생존율의 최댓값  
b,d: 각각의 세포 생존율 a와 c값을 나타내는 농도

#### 12-1-33-3-4. CD86, CD54 발현 측정

12-1-33-3-4-1. 시험물질 조제: 적절한 용매 (생리식염수, 배지 또는 DMSO)을 이용하여 1.2 × CV75의 100배 (생리식염수, 세포배양배지의 경우) 또는 500배(DMSO의 경우) 농도로 시험물질을 준비한다. 이후 1.2배 연속 희석하여 생리식염수나 배지의 경우 100 × 1.2 × CV75 ~ 100 × 0.335 × CV75의 8가지 농도, DMSO의 경우에는 500 × 1.2 × CV75 ~ 500 × 0.335 × CV75의 8가지 농도로 준비한다. 이 8가지 농도의 시험물질을 배지로 50배(생리식염수나 배지의 경우) 또는 250배 (DMSO 경우)로 추가 희석한다. 이 시험 용액은 plate 내에서 최종적으로 2배 더 희석되어 사용된다. 용량설정시험에서 CV75를 확인할 수 없을 경우, 초대환 용해할 수 있거나 안정적으로 분산시킬수 있는 농도를 시작농도로 사용해야 한다. plate에서의 최종 농도가 5000 ug/ml (생리식염수, 배지) 또는 1000 ug/ml (DMSO)를 초과해서는 안된다.

12-1-33-3-4-2. 양성대조군: 양성대조물질로는 DNCB를 사용하며, DMSO로 2 mg/ml DNCB 표준 원액을 준비한다. 배지로 250배 추가 희석하여 8 ug/ml의 시험용액으로 만들고 plate 내에서 최종 농도는 4 ug/ml로 한다.

12-1-33-3-4-3. 시험물질 및 대조물질 처리: 최소 두 번의 독립적인 반복실험을 수행해야 한다. 500 ul 시험물질 또는 대조물질은 500 ul 세포 현탁액(1×10<sup>6</sup> 세포)에 1:1비율로 혼합하고 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 배양기에서 24시간 동안 배양한다.

12-1-33-3-4-4. 세포 염색: 24시간 동안 노출 후, 24-well plate에서 샘플 튜브로 세포를 옮겨 원심분리로 수집한다. 1 ml의 염색 완충액으로 두 번 세척하고, 600 ul 차단용액(blocking solution)으로 처리하여 4°C에서 15분 동안 배양한다. 세포를 180 ul씩 3개의 시료 분취액으로 나누어 96-well plate나 마이크로 튜브로 분주한다. 원심분리 후 세포는 50 ul의 FITC-labelled anti-CD86, anti-CD54 또는 마우스 IgG1 항체로 4°C에서 30분 동안 염색한

다. 염색 후 150 ul 이상의 염색 완충액으로 두 번씩 이상 세척한다. 세포를 염색 완충액 400 ul로 다시 현탁시키고, PI 용액(최종 농도 0.625 ug/ml)을 첨가한다.

12-1-33-3-5. 결과 산출: 유세포 분석기 FL-1 채널을 이용하여 CD86과 CD54의 발현을 분석하고, CD86과 CD54의 상대적 형광강도(RFI)를 산출한다. 또한 세포생존율을 산출한다.

$$RFI = \frac{\text{시험물질처리세포 MFI} - \text{시험물질처리 동형대조군 세포 MFI}}{\text{용매처리대조군 세포 MFI} - \text{용매처리 동형대조군 세포 MFI}} \times 100$$

12-1-33-3-6. 시험의 적정성 요건을 충족시켜야 한다.

12-1-33-4. U-SENS™ <신설 2020.12.10.>

12-1-33-4-1. U937 세포 관리 및 배양

12-1-33-4-1-1. U937(Human histiocytic lymphoma cell line) 세포는 해동 후 최대 7주까지 계대배양이 가능하며 21계대를 초과해서는 안 된다.

12-1-33-4-1-2. U937 세포의 반응성을 확인 후 적합한 세포만 시험에 사용해야 한다. 양성대조군인 TNBS (2,4,6-trinitro-benzene-sulfonic acid)와 음성대조군인 젓산(Lactic acid)을 이용하여 해동 후 최소 1주에 반응성 여부를 확인한다. TNBS는 세포 표면 표지자 CD86에 대해 양성반응을 보이고, 젓산은 CD86에 대해 음성반응을 보여야 한다.

12-1-33-4-1-3. 시험을 위해서 배양 플라스크에 U937 세포  $3 \times 10^5$  cells/ml 또는  $6 \times 10^5$  cells/ml의 밀도로 각각 2일 또는 1일 동안 배양한다. 시험 당일, 배양 플라스크에서 획득한 U937 세포는  $5 \times 10^5$  cells/ml의 농도로 새로운 배양배지에 재현탁하고, 96-well plate에 well 당 100 ul ( $0.5 \times 10^5$  cells/well)로 분주한다.

12-1-33-4-2. 시험물질 준비: 시험 당일 시험물질을 준비한다.

12-1-33-4-2-1. 용해도 확인: 배지나 DMSO(Dimethylsulfoxide)를 용매로 사용하여 50 mg/ml 농도로 시험물질이 용해 되는지 확인한다.

12-1-33-4-2-2. 대조군: 용매대조군으로 배지나 0.4% DMSO (용매 배지)를 사용한다. 양성대조군으로 TNBS (2,4,6-Trinitro -benzene-sulfonic acid)를 사용하며, 플레이트 내에서 최종 농도는 50 ug/ml으로 한다. 음성대조군으로 젓산(용매 배지)을 사용하며, 플레이트 내에서 최종 농도는 200 ug/ml으로 한다. 별도로 무처리 대조군을 둔다.

12-1-33-4-2-3. 시험물질: 첫 번째 시험에 사용하기 위해 1, 10, 20, 50, 100, 200 ug/ml의 6개 농도를 준비한다. 두 번째 시험에서 용매가 배지인 경우 0.4 mg/ml, 용매가 DMSO인 경우 50 mg/ml 농도로 준비하고 추가로 희석하여 최소 4개의 농도 시험물질을 준비한다. 세포 배양액과 동일한 용량으로 시험

물질을 처리한다. 일반적으로 최종 농도는 1 ~ 200 ug/ml으로 한다. 1 ug/ml에서 CD86 양성 반응이 관찰되면 0.1 ug/ml에서 시험한다.

12-1-33-4-3. 시험물질 처리: 96-well plate에 세포 배양액과 동등한 양으로 시험 물질을 처리하고, 45±3 시간, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양한다.

12-1-33-4-4. 세포 염색: 시험물질 처리 후 원심분리하여 상등액을 버리고 남아있는 세포를 차가운 염색 완충액(소혈청 포함 PBS) 100 ul로 세척한다. 세포를 100 ul 염색완충액으로 현탁시키고, FITC-labelled anti-CD86 또는 마우스 IgG1 항체(isotype)로 4°C, 암실에서 30분 동안 염색한다. 염색 후 100 ul 염색 완충액으로 두 번 세척하고, 차가운 PBS 100 ul로 다시 한번 세척한다. 세포를 차가운 PBS로 다시 현탁 시키고, PI 용액(최종 농도 3 ug/ml)을 첨가한다.

12-1-33-4-5. 결과 산출: 유세포분석기(Flow cytometry)를 이용하여 CD86 발현 수준과 세포생존율을 측정한다. 세포생존율 70 %를 보이는 농도(CV70)과 CD86 자극지수(S.I.) 150 %를 유도하는 농도(EC150)를 구한다.

12-1-33-5. IL-8 Luc assay<신설 2020.12.10.>

12-1-33-5-1. THP-G8(IL-8 reporter cell line, THP-1(Human acute monocytic leukemia cell line)에서 유래) 세포 관리 및 배양

12-1-33-5-1-1. THP-G8 세포는 해동 후 최대 6주 또는 12 계대 까지 배양이 가능하다.

12-1-33-5-1-2. THP-G8 세포의 반응성을 확인 후 적합한 세포만 시험에 사용해야 한다. 양성대조군인 4-NBB (4-nitrobenzyl bromide)와 음성대조군인 젖산(Lactic acid)을 이용하여 해동 후 1~2주 또는 2~4 계대에 반응성 여부를 확인한다. 4-NBB는 Ind-IL8LA ≥ 1.4이어야 하며, 젖산은 Ind-IL8LA < 1.4이어야 한다.

12-1-33-5-1-3. 배양 플라스크에 THP-G8 세포 2~5×10<sup>5</sup> cells/ml 밀도로 48~96시간 동안 배양한다. 시험 당일, 배양 플라스크에서 획득한 THP-G8 세포는 1×10<sup>6</sup> cells/ml의 농도로 새로운 배양배지에 재현탁하고, 96-well plate에 well 당 50 ul (5×10<sup>4</sup> cells/well)씩 분주한다.

12-1-33-5-2. 시험물질 준비: 시험 당일 시험물질을 준비한다.

12-1-33-5-2-1. 대조군: 용매대조군으로 X-VIVOTM15와 세포 배양액의 혼합물(1:1)을 사용한다. 양성대조군으로 4-NBB를 사용하며, 음성대조군으로 젖산(용매 배지)을 사용한다.

12-1-33-5-2-2. 시험물질: X-VIVOTM15를 용매로 사용하여 4 mg/ml 농도 시험 물질을 stock solution으로 한다. 배지, 증류수, DMSO 등 다른 용매를 사용할 경우 타당한 근거를 제시하여야 한다. 첫 번째 시험에서 사용하기 위해 최종 시험물질 농도 0.002~2 mg/ml로 준비한다. X-VIVOTM15 stock solution에

용해되지 않는 시험물질은 2~210 희석배수로 결정하여 사용한다.

12-1-33-5-2-3. 이후 시험(2번째, 3번째, 4번째 시험)에서는 X-VIVOTM15 stock solution은 첫 번째 시험에서 Inh-GAPLA <0.05를 보이는 최소농도(CV05)의 4배 농도로 만든다. 첫번째 실험 최고농도에서 Inh-GAPLA가 0.05 미만으로 감소하지 않으면 첫 번째 실험 최고농도로 stock solution을 준비한다.

12-1-33-5-3. 시험물질 처리: 96-well plate(black plate)에 세포 배양액과 동등한 양으로 시험물질을 처리하고, 교반기(plate shaker)로 교반한다. 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 16 시간 배양한다.

12-1-33-5-4. luminometer를 이용하여 루시페라아제(luciferase) 활성을 측정한다.

### 12-1-34. 급성경구독성시험: 용량고저법(up and down procedure) <신설 2020.12.10.>

12-1-34-1. 시험농약: 원제 및 품목

12-1-34-2. 시험동물

12-1-34-2-1. 시험동물 및 계통: 선호하는 설치류는 랫드이나 다른 종의 설치류도 사용할 수 있다.

12-1-34-2-2. 연령: 건강하고 성숙된 동물로서 임신 및 출산 경험이 없는 개체를 선발하되, 투여를 시작할 때 8주~12주령이 되어야 하고 평균체중의 ±20% 범위 내에서 균일한 개체를 시험한다.

12-1-34-2-3. 성별: 주로 암컷을 사용하며 수컷으로 수행한 경우에는 합당한 근거를 제시해야 한다.

12-1-34-2-4. 시험동물수: 한계 시험에서는 최대 5 마리의 동물을 순차적으로 사용한다. 본 시험에서는 투여용량 당 한 마리의 동물을 사용한다.

12-1-34-3. 약제의 조제<신설 2020.12.10.>

12-1-34-3-1. 용매의 선택: 시험농약을 그대로 투여하거나 물 또는 오일(예, corn oil)과 같은 적당한 용매에 용해 또는 현탁시켜 투여한다. 이외의 용매를 사용할 경우 사전에 독성 여부와 물리화학적 특성이 잘 알려진 것을 사용한다.

12-1-34-3-2. 투여액량: 용매를 사용할 경우 설치류에서는 보통 부피가 체중 100g당 1ml을 초과해서는 안 된다. 그러나 물에 녹인 경우에는 체중 100g당 2ml까지 허용한다.

12-1-34-4. 시험물질 투여 용량 수준설정

12-1-34-4-1. 한계시험: 한계시험은 기존의 독성정보를 통해 시험물질의 독성이 없거나, 규제농도 이하로 낮을 것으로 판단되는 경우에 실시한다. 투여 용량은 2,000 mg/kg 또는 특수한 경우 5,000 mg/kg을 사용할 수 있으며, 투여 용량에 따라 절차를 달리 하여 시험을 수행한다.

12-1-34-4-1-1. 2,000 mg/kg 한계시험: 1마리의 동물에 2,000 mg/kg의 시험물질을 투여한다. 동물이 치사하는 경우 본시험을 수행하며, 생존하는 경우 순차적으로 4마리의 동물에 투여한다.

• 총 5마리의 동물 중 3마리의 동물이 치사하면 한계시험을 종료하고 본시험을 수행한다.

예시) (○=생존. X=치사)

○ X ○ X X

○ ○ X X X

○ X X ○ X

○ X X X

• 3마리 이상의 동물이 생존하면 LD<sub>50</sub>을 2,000 mg/kg 초과로 판정한다.

예시) (○=생존. X=치사)

○ ○ ○ ○ ○

○ ○ ○ X ○

○ ○ ○ ○ X

○ ○ ○ XX

○ X ○ X ○

○ X ○ ○ ○ / X

○ ○ X X ○

○ ○ X ○ ○ / X

○ XX ○ ○

12-1-34-4-1-2. 5,000 mg/kg 한계시험: 1마리의 동물에 5,000 mg/kg의 시험물질을 투여한다. 동물이 치사하는 경우 본시험을 수행하며, 생존하는 경우 2마리의 동물에 추가로 투여한다. 2마리 모두 생존하면 LD<sub>50</sub>은 5,000 mg/kg bw 초과로 판정하고 한계시험을 종료한다. 추가로 투여한 2마리 중 1마리 또는 2마리가 치사하면 순차적으로 2마리의 동물에 시험물질을 투여한다.

• 3마리 이상의 동물이 치사하면 LD<sub>50</sub>는 5,000 mg/kg 미만으로 판정한다.

예시) (○=생존. X=치사)

○ X ○ XX

○ ○ X XX

○ XX ○ X

○ XX X

• 3마리 이상의 동물이 생존하면 LD<sub>50</sub>은 5,000 mg/kg 초과로 판정한다.

예시) (○=생존. X=치사)

- ○ ○
- X ○ X ○
- X ○ ○
- ○ X X ○
- ○ X ○
- XX ○ ○

12-1-34-4-2. 본 시험: LD<sub>50</sub>에 대한 정보가 없는 경우, 첫 번째 투여 용량은 175 mg/kg으로 한다. 시험물질을 정해진 용량 순서에 따라 최소 48 시간 간격으로 동물 1마리에 순차적으로 투여한다. 첫 번째 동물에는 LD<sub>50</sub> 예상치보다 한 단계 낮은 수준의 용량을 투여한다. 첫 번째 동물이 생존하는 경우, 두 번째 동물에는 첫 번째 투여 용량에 공비를 적용하여 증가한 용량을 투여 한다 (공비는 용량-반응 곡선의 기울기에 대한 정보를 바탕으로 정해진 경우 해당 공비를 적용하며, 공비를 정할 수 없는 경우 3.2를 적용한다. 공비가 적용된 투여 용량은 1.75, 5.5, 17.5, 55, 175, 550, 2000 mg/kg (또는 특정 규제 요구에 대해 1.75, 5.5, 17.5, 55, 175, 550, 1750, 5000 mg/kg)에서 선택한다.). 두 번째 동물이 치사하는 경우, 그 다음 동물에는 종전에 적용시킨 해당 공비에 따라 감소시킨 용량을 투여한다. 다음 동물에 순차적으로 시험을 수행할지 여부 또는 용량 결정 여부 등은 투여한 동물에 대한 치사여부를 48 시간 동안 주의 깊게 관찰한 후 결정한다.

12-1-34-4-2-1. 본 시험 종료 기준 : 일정시간 간격(48시간 등)에 따라 동물의 상태를 고려하여 투여 여부를 결정한다. 다음 <본시험 종료기준> 중 하나라도 해당하면 본 시험을 종료한다.

<본시험 종료기준>

연속 3마리의 동물이 상한 용량에서 생존한 경우  
 연속적으로 투여한 6마리 동물에서 5차례 역전반응\*이 일어난 경우  
 첫 번째 역전반응 이후, 최소한 4마리의 동물시험이 진행되고 특정한 likelihood-ratio(LR)가 기준값을 초과하는 경우

\* 역전반응(reversal): 어떤 용량에서 반응이 나타나지 않으나, 다음 용량에서 반응이 관찰될 때 또는 그 반대의 경우를 의미함

12-1-34-5. 시험물질 투여방법

12-1-34-5-1. 시험물질은 적절한 삽입관을 사용하여 1회 위내에 강제 경구 투여하며, 한 번에 투여가 불가능한 특수한 경우 24시간이내에 여러 번 1회 분량으로 투여할 수 있다.

12-1-34-5-2. 투여 전에 랫드는 하룻밤 절식시키고, 마우스는 3~4시간 절식시킨다.

- 12-1-34-5-3. 절식 후 실험동물의 체중을 측정하고, 그 체중에 따라 약량을 산출해 시험물질을 투여한다.
- 12-1-34-5-4. 시험물질 투여한 후에 랫드는 3~4시간, 마우스는 1~2시간 후 까지 절식시킨다.
- 12-1-34-6. 관찰기간: 투여 후 처음 30분 동안 최소한 한 번은 실험동물을 개별적으로 관찰하고, 처음 24시간 동안 일정시간마다 관찰한다. 특히 투여 후 처음 4시간은 주의를 기울여 관찰한다. 일반적으로 14일 동안 동물을 관찰하지만, 독성 반응, 발병시간, 회복기간에 따라 필요한 경우 변경할 수 있다.
- 12-1-34-7. 관찰항목
- 12-1-34-7-1. 임상관찰: 육안으로 관찰되는 독성징후의 종류, 회복시기 및 치사시기 등 모든 관찰사항을 체계적으로 기록한다.
- 12-1-34-7-2. 체중측정: 시험물질을 투여하기 직전에 각 동물의 체중을 측정하고, 그 후로 최소한 일주일에 한 번씩 측정해야 한다. 시험 종료 시 생존한 동물의 체중을 측정한 후 인도적으로 안락사 시킨다.
- 12-1-34-7-3. 부검소견: 실험동물은 모두 부검해야 하며, 각 동물의 모든 병리적 변화를 기록해야 한다.
- 12-1-34-8. 반수치사약량(LD<sub>50</sub>) 산출 : 시험 종료 후 AOT425Statistical program 을 이용하여 반수치사약량(LD<sub>50</sub>)를 산출한다.

**12-1-35. ARE-Nrf2 루시퍼라제 시험법(ARE-Nrf2 Luciferase test):  
LuSens™를 이용한 시험법 <신설 2023.10.11.>**

- 12-1-35-1. 시험농약: 원제
- 12-1-35-2. 세포주 종류: LuSens™는 국제적(OECD)으로 검증된 세포를 사용한다.
- 12-1-35-3. 세포 관리 및 배양
- 12-1-35-3-1. LuSens™ 세포주는 수령하자마자 계대배양(1-3계대)하여 동결보관한다. 동결보관 세포주에 대해서는 최대 20계대까지 증식시켜 사용한다. 단, 세포독성시험은 20계대, 루시퍼라제 활성측정은 15계대까지 사용한다.
- 12-1-35-3-2. 세포배양은 혈청과 항생제를 포함한 적절한 배양배지를 사용하며 시험 중에는 배지에 항생제를 넣지 않는다.
- 12-1-35-3-3. 세포주는 시험 전날 96-well 플레이트에 well당 10,000개 세포 밀도로 배양하여 매 시험마다 루시퍼라제 활성과 세포독성을 3번 반복하여 측정한다.
- 12-1-35-4. 시험물질 및 대조물질
- 12-1-35-4-1. 시험물질은 시험당일 순도 99% 이상의 DMSO(dimethyl sulfoxid

e)에 용해시킨다. 시험물질이 DMSO에 용해되지 않는 경우 멸균수 또는 배양 배지를 사용하되, 여과하여 멸균한다.

12-1-35-4-2. 용매대조물질은 DMSO 또는 시험물질을 용해시킨 용매를 사용한다. 용매대조물질은 세포독성시험의 경우 플레이트 당 12개의 well, 루시퍼라제 활성측정시험의 경우 플레이트 당 24개의 well을 사용한다.

12-1-35-4-3. 음성대조물질은 순도 99% 이상의 DL-락트산(DL-Lactic acid)을 5000  $\mu\text{M}$ (또는 450  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )의 농도로 조제한다. 음성대조물질은 세포독성시험의 경우 플레이트 당 3개의 well, 루시퍼라제 활성측정시험의 경우 플레이트당 6개의 well을 사용한다. 배지대조물질은 세포독성시험의 경우 플레이트 당 6개의 well, 루시퍼라제 활성측정시험의 경우 플레이트당 12개의 well을 사용한다.

12-1-35-4-4. 양성대조물질은 순도 99% 이상의 에틸렌 글라이콜 디메트아크릴레이트(Ethylene glycol DimethyAcrylate)을 120  $\mu\text{M}$  농도로 조제하여 사용한다. 만약 해당 농도에서 세포생존율이 70%에 도달하지 않거나 루시퍼라제 활성이 용매대조물질 대비 2.5배 이상 유도하지 않는 경우 양성대조물질의 범위를 설정하기 위한 시험을 수행하도록 한다. 양성대조물질은 세포독성시험의 경우 플레이트 당 2개의 well, 루시퍼라제 활성측정시험의 경우 플레이트당 5개의 well을 사용한다.

12-1-35-5. 숙련도 검증

12-1-35-5-1. 숙련도의 검증은 국제적(OECD)으로 권고하고 있는 숙련도물질 중 최소 8종이상에 대해 각 기준범위를 충족하여 기술적 숙련도를 입증하여야 한다.

12-1-35-6. 물질 처리

12-1-35-6-1. 결과를 예측하는 데 최소 2번의 독립적인 반복시험이 필요하며, 각 반복시험은 3개의 같은 well로 구성되어야 한다. 두 번의 반복시험이 일치하지 않으면 세 번째 반복시험을 해야 한다.

12-1-35-6-2. 물질을 처리한 플레이트는  $37\pm 1^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  조건에서 48시간 배양한다. 시험물질을 처리하는 동안 플레이트를 덮어 휘발성 시험물질의 증발과 각 well 간 교차오염이 되지 않도록 한다.

12-1-35-7. 세포독성 측정: 시험물질 노출 48시간 후 시험물질이 함유된 배지를 제거하고 티아졸일 블루 테트라졸륨 브로마이드(Thiazolyl blue tetrazolium bromide, MTT)를 함유하는 새로운 배지로 교체한다.  $37\pm 1^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  조건에서 2시간 배양 후 MTT 배지를 제거한다. DMSO 용액(10% SDS 및 0.4% acetic acid 포함)을 첨가하여 5분 동안 용해 후 600 nm에서 흡광도를 측정한다.

12-1-35-8. 루시퍼라제 활성 측정: 시험물질 노출 48시간 후 시험물질이 함유된 배지를 제거하고 인산완충 생리식염수(PBS)로 세척한다. 발광도 측정을 위하

여 세포 용해 완충액(lysis buffer)을 첨가한 후 암실에서 5-10분 반응시킨다. 루시퍼라제 기질을 첨가한 후 발광측정기(luminometer)를 이용하여 활성을 측정한다.

12-1-35-9. 결과 산출: 시험물질의 각 농도( $CV_{75}/2.07$ ,  $CV_{75}/1.73$ ,  $CV_{75}/1.44$ ,  $CV_{75}/1.2$ ,  $CV_{75}$  및  $CV_{75} \times 1.2 \mu M$ ) 및 대조물질에서 루시퍼라제 활성 유도 배수, 세포 생존율을 산출한다.

12-1-35-10. 시험의 적정성: 시험법에 따른 적정성 요건을 충족하여야 한다.

### 12-1-36. 에스트로겐 수용체 전사활성 시험 <신설 2023.10.11.>

12-1-36-1. 시험농약: 원제

12-1-36-2. 세포주 종류: 시험 방법에 따라 규정된 세포주를 사용하고, 마이크로플라즈마에 오염되지 않은 세포만 사용한다.

분석법	세포주
STTA 분석법	hER $\alpha$ -HeLa-9903
VM7Luc ER TA 분석법	VM7Luc4E2
ER $\alpha$ CALUX 분석법	U2OS ER $\alpha$ CALUX

12-1-36-3. 세포 관리 및 배양

12-1-36-3-1. 배양과 시험에 사용되는 배지는 에스트로겐이 함유되지 않은 배지를 사용하고, 분석에 사용되는 플라스틱 용기는 에스트로겐 활성이 없는 것을 사용한다.

12-1-36-3-2. hER $\alpha$ -HeLa-9903의 배양

12-1-36-3-2-1. 배지는 60mg/L Kanamycin과 Dextran coated charcoal이 처리된 10% fetal bovine serum(DCC-FBS)이 포함된 EMEM(Eagle's Minimum Essential Medium)을 사용하고, EMEM의 경우 phenol red가 포함되어 있지 않아야 한다.

12-1-36-3-2-2. 동결 보존된 세포는 1계대 이상 배양하여 사용하되, 40계대 이상으로 배양하지 않는다. 동결 세포를 사용할 때는 해동한지 3개월 이내의 세포를 사용한다.

12-1-36-3-3. VM7Luc4E2의 배양

12-1-36-3-3-1. 세포 배양 배지는 0.9% penicillin-streptomycin과 8% FBS가 포함된 RPMI1640 배지를 사용한다.

12-1-36-3-3-2. 시험물질에 노출하기 전에 96-well plate에 세포를 분주하고, CO<sub>2</sub> 배양기에서 5% CO<sub>2</sub>, 온도 37 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C, 습도 90 $\pm$ 5% 조건에서 배양한다. 이때 배지는 4.5% DCC-FBS, 1.9% L-glutamine, 0.9% penicillin-streptomycin이 포함된 DMEM(Modification of Eagle's Medium)를 사용하고, DMEM의 경우 phenol red가 없는 것을 사용한다.

12-1-36-3-3-3. 동결 보존된 세포는 1계대 이상 배양하여 사용하되, 30계대 이상으로 배양하지 않는다. 동결 세포를 사용할 때는 해동한지 3개월 이내의 세포를 사용한다.

12-1-36-3-4. U2OS ERα CALUX 배양

12-1-36-3-4-1. 세포배양배지는 7.5% FBS, 1% non-essential amino acid, 10 Units/mL의 penicillin과 streptomycin 및 geneticin이 함유되어 있고, phenol red가 포함 된 DMEM/F12(1:1)배지를 사용한다.

12-1-36-3-4-2. 세포활성 분석을 위한 배지는 5% DCC-FBS, 1% non-essential amino acid, penicillin 10 Units/mL와 streptomycin이 함유되어 있고, phenol red가 없는 DMEM/F12(1:1)배지를 사용한다.

12-1-36-3-4-3. 동결 보존된 세포는 2계대 이상 배양하여 사용하되, 30계대 이상으로 배양하지 않는다.

12-1-36-4. 기준물질(Reference standard) : 세포의 안정성과 시험의 민감성을 확인 하기 위해 적합성 확인을 해야 한다. 기준물질은 아래와 같고, 적합성 범위는 국제적인(OECD) 시험방법에 기술된 결과에 따른다.

12-1-36-4-1. STTA 분석법의 기준물질

에스트로겐 수용체 작용물질

물질명	CAS No.	비고
17β-Estradiol	50-28-2	강한 에스트로겐물질
17α-Estradiol	57-91-0	약한 에스트로겐물질
17α-Methyltestosterone	58-18-4	매우 약한 에스트로겐물질
Corticosterone	50-22-6	음성물질

에스트로겐 수용체 길항물질

물질명	CAS No.	비고
Tamoxifen	10540-29-1	양성물질
Flutamide	13311-84-7	음성물질

12-1-36-4-2. VM7Luc ER TA 분석법의 기준물질

물질명	CAS No.	비고
17β-Estradiol	50-28-2	에스트로겐 수용체 작용물질
17β-Estradiol, Ral 혼합*	50-28-2, 84449-90-1	에스트로겐 수용체 길항물질

\*17β-estradiol, Ral 혼합물은 국제적인 시험방법을 따른다.

12-1-36-4-3. ERα CALUX 분석법의 기준물질

물질명	CAS No.	비고
17β-Estradiol	50-28-2	에스트로겐 수용체 작용물질

물질명	CAS No.	비고
Tamoxifen	10540-29-1	에스트로겐 수용체 길항물질

#### 12-1-36-5. 대조물질

##### 12-1-36-5-1. 에스트로겐 수용체 작용물질 시험에서의 대조물질

분석법	대조물질	비고
STTA 분석법	17 $\beta$ -estradiol(CAS No. 50-28-2)	양성
	Corticosterone(CAS No. 50-22-6)	음성
VM7Luc ER TA 분석법	p,p'-methoxychlor(methoxychlo)(CAS No. 72-43-5)	양성
	17 $\beta$ -estradiol(CAS No.50-28-2)	음성
ER $\alpha$ CALUX 분석법	17 $\alpha$ -methyltestosterone(CAS No. 58-18-4)	양성
	Corticosterone(CAS No. 50-22-6)	음성

##### 12-1-36-5-2. 에스트로겐 수용체 길항물질 시험법에서의 대조물질

분석법	대조물질	비고
STTA 분석법	Tamoxifen(CAS No. 10540-29-1)	양성
	Flutamide(CAS No. 13311-84-7)	음성
VM7Luc ER TA 분석법	17 $\beta$ -estradiol(CAS No.50-28-2)이 혼합된 Tamoxifen(CAS No. 10540-29-1)	양성
	17 $\beta$ -estradiol(CAS No.50-28-2)	음성
ER $\alpha$ CALUX 분석법	4-hydroxytamoxifen(CAS No. 68047-06-3)	양성
	Resveratrol(CAS No. 501-36-0)	음성

#### 12-1-36-6. 용매

12-1-36-6-1. 시험에 사용되는 용매는 디메틸설폭사이드(DMSO), 물, 에탄올(순도 95~100%)을 사용하고 DMSO의 경우 배지 내 용매 최종농도가 0.1% (v/v)를 넘지 않아야 한다.

12-1-36-6-2. 용매는 최대 사용량에서 세포독성을 나타내지 않으며 시험 수행 과정에 간섭하지 않아야 하고, 용매를 사용하였을 경우, 용매대조군에 대한 시험을 추가로 수행한다.

#### 12-1-36-7. 숙련도 검증

12-1-36-7-1. 숙련도의 검증은 에스트로겐 수용체 작용물질과 길항물질에 대하여 각각 수행한다. 국제적(OECD)으로 권고하고 있는 숙련도물질 대하여 검증하며, 최소한 2번 이상 수행하고, 서로 다른 날에 시험한다. 또한, 각 시험법에 해당하는 적합성 범위는 국제적인 시험방법에 기술된 결과에 따른다.

#### 12-1-36-8. 시험방법

#### 12-1-36-8-1. 시험군 구성

12-1-36-8-1-1. 시험군은 대조군(양성, 음성 대조군)과, 기준물질 시험군, 시험물질으로 구성하고, 용매를 사용하였을 경우에는 용매 대조군을 추가로 설정하여 시험한다.

12-1-36-8-1-2. 시험물질군은 STTA 분석법에서는 7개 농도, 길항물질시험 6개 농도로 시험한다. VM7Luc ER TA 분석법은 11개 농도, ER $\alpha$  CALUX 분석법의 경우 8개 농도로 시험한다.

#### 12-1-36-8-2. 시험물질 준비

12-1-36-8-2-1. 시험물질은 100% DMSO(또는 물, 에탄올(순도 95~100%))에 녹이고, 배양 배지로 적절한 농도로 희석한다.

12-1-36-8-2-2. 시험물질은 조제 전에 실온에서 평형을 이루도록 한다. 조제된 시험물질은 침전이나 혼탁이 없어야 한다.

12-1-36-8-2-3. 시험물질은 매 실험마다 조제하고, 24시간 이내에 사용한다.

#### 12-1-36-8-3. 농도설정

12-1-36-8-3-1. 시험물질의 농도결정 이전, 예비시험을 통해 용해농도 및 세포독성을 확인해야 한다.

12-1-36-8-3-2. 시험물질은 1  $\mu$ L/mL, 1 mg/mL, 1 mM 중 적절한 농도로 시험하고, 세포독성이 관찰되거나, 물질이 용해되지 않아 혼탁 또는 침전이 관찰되었을 경우, 일정 배율로 단계 희석하여 시험한다.

12-1-36-8-3-3. 세포 생존율이 20% 이상 감소된 시험물질 농도는 세포독성이 있다고 간주하고 그 이상의 농도는 사용하지 않는다.

#### 12-1-36-8-4. 시험물질의 노출 및 분석

12-1-36-8-4-1. 96-well plate에서 시험 전 배양한 세포에 농도 별 각 3개 well을 사용하여 시험물질, 대조물질, 기준물질을 처리한다.

12-1-36-8-4-2. 시험물질 처리 후 CO<sub>2</sub> 배양기에서 STTA 분석법 20-24시간, VM7Luc ER TA 분석법 19-24시간 배양한다.

12-1-36-8-4-3. 휘발성이 높은 시험물질은 plate 주변을 밀봉하여 인접한 well에 미치는 영향을 차단하도록 한다.

12-1-36-8-4-4. 동일물질에 대한 반복시험을 시험일자가 다르게 수행한다.

#### 12-1-36-8-5. 루시페라제 활성 측정

12-1-36-8-5-1. 세포를 용해시킨 후, 기질인 루시페린을 첨가하여 방출하는 발광량을 측정함으로써 well 당 RLU를 표현한다.

#### 12-1-36-9. 시험결과 분석

##### 12-1-36-9-1. 에스트로젠 수용체 작용물질

12-1-36-9-1-1. 용매 대조군의 평균값을 계산한다.

12-1-36-9-1-2. 각 well의 값에서 용매 대조군의 평균값을 뺀 값으로 전사활성

을 계산한다.

12-1-36-9-1-3. 기준물질 최대농도에 대한 유도 배율의 평균값을 계산하고, 이를  $PC_{100}$ 으로 한다.

12-1-36-9-1-4. 시험물질에 대한 상대적 전사활성의 평균값을 계산한다.

12-1-36-9-1-5.  $PC_{50}$ ,  $PC_{10}$ ,  $EC_{50}$ ,  $EC_{10}$ 을 계산하기 위하여 적절한 통계프로그램을 사용한다.

12-1-36-9-1-6. 시험물질은 세포독성이나 용해도 문제 때문에 완전한 용량-반응 곡선을 그리지 않을 수도 있으며, 이 경우에는  $PC_{10}$ 과 시험물질의 상대적 최대 활성 유도( $TC_{max}$ ) 만을 결정한다.

12-1-36-9-2. 에스트로겐 수용체 길항물질

12-1-36-9-2-1. 용매 대조군의 평균값을 계산한다.

12-1-36-9-2-2. 각 well의 값에서 용매 대조군의 평균값을 뺀 값으로 전사활성을 계산한다.

12-1-36-9-2-3. 기준물질 최대농도에 대한 유도 배율의 평균값을 계산하고, 이를  $PC_{100}$ 으로 한다.

12-1-36-9-2-4. 시험물질에 대한 상대적 전사활성의 평균값을 계산한다.

12-1-36-9-2-5. 기준물질과 시험물질의  $IC_{50}$ ,  $IC_{30}$  또는  $IC_{10}$ 을 계산한다.

12-1-36-10. 시험의 성립기준

12-1-36-10-1. 시험자료는 반드시 에스트로겐 수용체 활성 또는 억제에 대한 정량적 평가를 하는데 충분해야 한다.

12-1-36-10-2. 에스트로겐의 기준농도에 대한 평균 활성도는 시험방법에서 규정된 최솟값을 나타내야 한다.

12-1-36-10-3. 시험농도는 반드시 시험물질의 용해범위 내에 있어야 하고 세포독성이 나타나지 않아야 한다.

12-1-36-11. 시험 자료의 판정

12-1-36-11-1. 에스트로겐 수용체 작용물질 시험의 경우, 기준물질의 최대 RLU (relative light unit) 평균값을 용매 대조군의 RLU 평균값으로 나눌 때 4 이상이어야 한다.

12-1-36-11-2. 에스트로겐 수용체 길항시험의 경우, 기준물질의 최대 RLU 평균값을 용매 대조군의 RLU 평균값으로 나눌 때 나누어 3 이상이어야 한다.

12-1-36-11-3. 허용 기준에 적합하고, 두 번의 시험에서 재현성이 확인되었다면 세 번째 시험을 수행할 필요는 없다. 두 번의 시험 시행에서 재현성이 없다면 적어도 세 번의 독립적인 시험을 수행하고 세 번 중 두 번에서 일치된 결과에 근거하여 분류한다.

12-1-36-11-4. 작용물질시험에서  $TC_{max}$ 가 기준물질 최대 반응의 10%( $PC_{10}$ )와 같거나 초과하면 양성으로 판정한다.

12-1-36-11-5. 길항물질 시험에서 상대적 전사활성이 기준물질 최대 반응의 20%(IC<sub>20</sub>) 이상 억제하거나 또는 시험물질의 IC<sub>30</sub>이 계산되는 경우 양성으로 판정한다.

12-1-36-12. 각 시험법에 따른 국제적(OECD) 적정성 요건을 충족하여야 한다.

### 12-1-37. 안드로젠 수용체 전사활성 시험 <신설 2023.10.11.>

12-1-37-1. 시험농약: 원제

12-1-37-2. 세포주 종류:

분석법	세포주
AR-EcoScreen 시험법	AR-EcoScreen
AR-CALUX 시험법	AR-CALUX
ARTA 시험법	22Rv1/MMTV_GR-KO

12-1-37-3. 세포관리 및 배양

12-1-37-3-1. AR-EcoScreen의 배양

12-1-37-3-1-1. 세포유지 배지는 200 µg/mL Zeocin, 100 µg/mL Hygromycin, 100 units/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin 및 5% fetal bovine serum (FBS)가 포함된 DMEM/F-12을 사용하고, phenol red가 포함되어 있지 않아야 한다.

12-1-37-3-1-2. 분석배지는 100 units/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin 및 Dextran coated charcoal이 처리된 5% fetal bovine serum(FBS)가 포함된 DMEM/F-12을 사용하고, phenol red가 포함되어 있지 않아야 한다.

12-1-37-3-1-3. 동결 보존된 세포는 1계대 이상 배양하여 사용하되, 40계대 이상으로 배양하지 않는다. 동결 세포를 사용할 때는 해동한지 3개월 이내의 세포를 사용한다.

12-1-37-3-2. AR-CALUX의 배양

12-1-37-3-2-1. 배지는 1% v/v non-essential amino acids, 10 units/mL Penicillin, 10 µg/mL Streptomycin 및 Dextran coated charcoal이 처리된 7.5% fetal bovine serum(FBS)가 포함된 DMEM/F-12을 사용한다.

12-1-37-3-2-2. 동결 보존된 세포는 적어도 2계대 이상 배양하여 사용하되, 30계대 이상으로 배양하지 않는다.

12-1-37-3-3. 22Rv1/MMTV\_GR-KO의 배양

12-1-37-3-3-1. 세포유지 배지는 2 mM GlutaMAX, 0.25 µg/mL Amphotericin B, 100 units/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin 및 10% fetal bovine serum(FBS)가 포함된 RPMI1640를 사용한다.

12-1-37-3-3-2. 분석배지는 2 mM GlutaMAX, 0.25 µg/mL Amphotericin B, 100 units/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin 및 Dextran coated charcoal

이 처리된 5% fetal bovine serum(FBS)가 포함된 RPMI1640를 사용하고, phenol red가 포함되어 있지 않아야 한다.

12-1-37-3-3. 동결 보존된 세포는 적어도 2세대 이상 배양하여 사용하되, 30세대 이상으로 배양하지 않는다.

12-1-37-4. 기준물질(Reference standard) : 세포의 안정성과 시험의 민감성을 확인 하기 위해 적합성 확인을 해야 한다. 기준물질은 아래와 같고, 적합성 범위는 국제적인(OECD) 시험방법에 기술된 결과에 따른다.

12-1-37-4-1. AR-EcoScreen 시험법

12-1-37-4-1-1. 안드로겐 수용체 작용물질 시험에서 세포의 안정성을 확인하기 위해 양성표준물질인 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone (DHT)와 Mestanolone, 음성표준물질인 di(2-ethylhexyl) -phthalate(DEHP)를 사용한다.

12-1-37-4-1-2. 안드로겐 수용체 길항물질 시험에서 세포의 안정성을 확인하기 위해 양성물질인 Hydroxyflutamide와 Bisphenol A(BPA), 음성표준물질인 DEHP를 사용한다.

12-1-37-4-2. AR-CALUX 시험법

12-1-37-4-2-1. 안드로겐 수용체 작용물질 시험에서 세포의 안정성을 확인하기 위해 양성 표준물질인 DHT와 17 $\alpha$ -Methyltestosterone, 음성표준물질인 Corticosterone을 사용한다.

12-1-37-4-2-2. 안드로겐 수용체 길항물질 시험에서 세포의 안정성을 확인하기 위해 양성물질인 Flutamide와 Linuron, 음성표준물질인 Levonorgestrel을 사용한다.

12-1-37-4-3. ARTA 시험법

12-1-37-4-3-1. 안드로겐 수용체 작용물질 시험에서 세포의 안정성을 확인하기 위해 양성표준물질인 DHT와 Mestanolone, 음성표준물질인 DEHP를 사용한다.

12-1-37-4-3-2. 안드로겐 수용체 길항물질 시험에서 세포의 안정성을 확인하기 위해 양성물질인 Bicalutamide와 BPA, 음성표준물질인 DEHP를 사용한다.

12-1-37-5. 숙련도 검증

12-1-37-5-1. 숙련도의 검증은 안드로겐 수용체 작용물질과 길항물질에 대하여 각각 수행한다. 안드로겐 수용체 작용물질시험에서는 최소 8종 이상, 길항물질 시험에서는 최소 9종 이상의 물질에서 숙련도를 검증해야 한다.

12-1-37-5-2. 국제적(OECD)으로 권고하고 있는 숙련도물질 대하여 검증하며, 최소한 2번 이상 수행하고, 서로 다른 날에 시험한다. 또한 각 시험법에 해당하는 적합성 범위는 국제적인 시험방법에 기술된 결과에 따른다.

12-1-37-6. 물질처리

12-1-37-6-1. 용매는 멸균수, 에탄올, DMSO를 사용한다. 일반적으로 DMSO를

사용하며, well 당 배지 중 DMSO 최종 농도가 0.1%가 넘지 않도록 한다.

#### 12-1-37-6-2. 시험물질 준비

12-1-37-6-2-1. 시험물질은 매 실험마다 조제하고, 24시간 이내에 제조한 것을 사용한다.

12-1-37-6-2-2. 용매를 이용하여 시험물질을 연속적으로 10배 희석하며, 최대 용해 농도를 확인하고 세포독성시험을 수행한다.

12-1-37-6-2-3. 세포독성시험은 renilla luciferase 활성을 이용하여 세포생존율을 측정한다. renilla luciferase 활성이 20% 이상 감소되면 세포독성이 있는 것으로 간주하며, 해당 농도 이상의 시험물질 농도는 평가에서 배제한다.

#### 12-1-37-7. 시험물질의 노출

12-1-37-7-1. 안드로겐 수용체 작용물질시험 및 길항물질시험에서는 각 시험법마다 정해진 대조물질, 세포독성 양성 기준물질, 기준물질 및 용매 등을 처리한 균을 두어 시험결과의 분석이 가능하도록 한다.

12-1-37-7-2. 시험물질을 처리한 후 분석 플레이트는 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 배양기에서 약 20 ~ 24시간 동안 배양한다.

12-1-37-7-3. 동일 시험물질에 대한 반복 시험(repeat definitive test)는 다른 일자에 수행해야 한다.

12-1-37-7-4. 루시페라아제(luciferase) 활성 측정은 Dual-reporter assay system을 이용한다.

#### 12-1-37-8. 시험결과의 분석

12-1-37-8-1. 양성대조물질에 대한 상대 전사 활성을 산출하기 위해 동일한 plate로부터 루미노발광 신호를 분석한다.

12-1-37-8-2. logPC<sub>50</sub>, logPC<sub>10</sub>, logIC<sub>50</sub>, logIC<sub>30</sub> 산출

12-1-37-8-2-1. 안드로겐 수용체 작용물질시험에서 RPC<sub>max</sub> (시험물질에 의해 유도되는 반응의 최고수치)를 구한다. 양성 시험물질의 경우, logPC<sub>50</sub>, logPC<sub>10</sub>를 산출한다.

12-1-37-8-2-2. 안드로겐 수용체 길항물질시험에서 양성 시험물질의 경우, logIC<sub>50</sub>, logIC<sub>30</sub>을 산출한다.

12-1-37-8-3. 결과 판정은 최소 두 번의 독립적인 실험을 수행하고 국제적(OECD) 결정기준에 따라 판정한다.

12-1-37-8-3-1. 안드로겐 수용체 작용물질시험에서 각 독립적인 시험의 RPC<sub>max</sub>가 양성대조물질 반응의 10%이상이면 양성으로 판정한다.

12-1-37-8-3-2. 길항물질시험에서 독립적인 시험의 logIC<sub>30</sub>이 산출되면 양성으로 판정한다.

12-1-37-8-4. 안드로겐 수용체 작용물질 및 길항물질 시험에 사용된 각 3가지 표준물질이 국제적 수용한계치(acceptable limit) 내에 포함되어야 하며 용량-

반응 곡선(concentration-response curve) 모양이 S자형(sigmoid)을 나타내야 한다.

12-1-37-9. 각 시험법에 따른 국제적(OECD) 적정성 요건을 충족하여야 한다.

## 12-2. 미생물농약 (이 기준에 없는 경우 화학농약 기준을 적용)

### 12-2-1. 급성경구독성/병원성시험

12-2-1-1. 시험물질 : 원제 및 품목

12-2-1-2. 시험동물

12-2-1-2-1. 동물종 : SPF 랫드의 사용을 원칙으로 하며 일반적으로 독성시험에 광범위 하게 사용되는 계통을 선정한다. 랫드 이외의 다른 포유동물종을 사용하였을 경우에는 그 선정사유를 명기하여야 한다.

12-2-1-2-2. 연령 : 건강하고 성숙된 동물로서 임신 및 출산경험이 없는 개체를 선발하되 성별로 평균체중의  $\pm 20\%$  범위내에서 균일한 개체를 사용한다.

12-2-1-3. 시험군 구성

12-2-1-3-1. 대조군 : 대조군(용매대조군 및 비투여대조군)은 군당 암수 각 2마리 이상으로 한다. 용매의 독성이 알려져 있지 않은 경우를 제외하고는 용매대조군을 별도로 두지 않아도 된다.

12-2-1-3-2. 투여군 : 중간부검군(3개군 - 투여 후 3일, 7일 및 14일) 및 최종 부검군을 두되 군당 암수 각 3마리 이상으로 한다.

12-2-1-4. 시험물질 투여

12-2-1-4-1. 미생물농약의 단위 : 일반적인 미생물의 1 단위는 다음과 같이 정의한다.

12-2-1-4-1-1. 발육형 세균 : 살아있는 생물체로 보통 적당한 반고체배지 위에서 하나의 독립 집락을 이루는 실체(Colony Forming Unit, CFU)

12-2-1-4-1-2. 세균 또는 진균의 포자, 세균 혹은 원충낭포 : 현미경적으로 관찰되는 완전히 개별적인 포자나 낭포로서 반고체의 적당한 성장배지 위에서 하나의 집락을 이루는 실체

12-2-1-4-1-3. 진균 균사체 : 건조무게  $10^{-9}g$  혹은 반고체의 적당한 성장배지 위에서 균사체를 형성하는 실체

12-2-1-4-1-4. 바이러스 : 전자현미경상에서 완전한 바이러스 혹은 다면체로 적절한 숙주 세포나 조직에서 감염단위를 형성하는 실체

12-2-1-4-2. 투여농도 : 투여농도는 개체당  $10^8$  단위이상에 해당하는 미생물농약을 투여한다. 만약 이보다 낮은 단위로 투여할 경우 그 정당성 혹은 타당성이 제시되어야 한다. <개정 2023.10.11.>

12-2-1-4-3. 용매의 선택 : 원제에 사용하는 용매는 미생물이 적절한 기주체내에서 생존, 발아, 탈피 혹은 감염능을 유지할 수 있는 것이어야 한다. 품목의

경우는 실제 농약 살포시 사용하는 물질(예:물)과 동일한 것으로 한다.

12-2-1-4-4. 투여용량 : 1회에 투여할 수 있는 최대용량은 동물의 크기에 따라서 다르나 설치류에 있어서는 개체당 2ml/100g를 초과하지 않는 범위내에서 투여용량의 변동폭을 최소화하여야 한다. <개정 2023.10.11.>

12-2-1-4-5. 투여방법 : 1회에 한하여 시험물질을 동물의 위내에 강제 경구투여 하되, 약제를 투여하기전 하룻밤 정도 절식시키고, 사료는 투여 3~4시간 후에 급여하도록 한다.

12-2-1-4-6. 1회 투여가 불가능한 경우, 투여량을 24시간 이내에 소량씩 분할 투여할 수 있다. 투여량이 24시간 이내에 걸쳐 분할 투여되는 경우 그 기간동안 동물에게 사료와 물을 급여할 수 있다. <신설 2023.10.11.>

12-2-1-5. 시험기간 : 투여 후 21일간 실시함을 원칙으로 하며, 단 동물체내 미생물의 잔존여부, 독성·병원성 발현 및 소실시기 그리고 시험동물의 폐사시간에 따라 시험기간을 달리할 수 있다.

12-2-1-6. 조사항목

12-2-1-6-1. 임상관찰 : 증상의 종류, 발현정도, 진행상황 및 가역성을 경시적으로 관찰, 기록한다. 최소한 매일 1회 이상 임상증상을 면밀히 관찰하여야 한다.

12-2-1-6-2. 체중측정 : 투여 직전, 투여 후 주 1회 및 부검시 또는 시험중 폐사시에 측정한다.

12-2-1-6-3. 육안적 병리소견 : 시험중에 빈사 또는 사망한 동물은 사망 즉시 부검하고, 사망일시 및 부검소견 등을 기록한다. 중간 및 최종부검시 모든 동물에 대하여 부검을 수행하여 육안적 병리소견을 기록하여야 한다.

12-2-1-6-4. 미생물의 체외 배출상황 : 대변중의 미생물수를 정기적(투여 후 1일, 3일, 7일 및 14일)으로 측정한다.

12-2-1-6-5. 미생물의 체내 잔존상황 : 부검군 동물의 신장, 뇌, 간장, 폐, 비장, 위, 혈액, 대표적인 임파절 및 육안적 병변이 보이는 각 장기중의 미생물수를 측정한다.

## **12-2-2. 급성경피독성시험**

12-2-2-1. 시험물질 : 원제 및 품목

12-2-2-2. 시험동물

12-2-2-2-1. 동물종 : SPF 랫드의 사용을 원칙으로 하며 일반적으로 독성시험에 광

범위하게 사용되는 계통을 선정한다. 랫드 이외의 다른 포유동물종을 사용하였을 경우에는 그 선정사유를 명기하여야 한다.

12-2-2-2-2. 연령 : 건강하고 성숙된 동물로서 임신 및 출산경험이 없는 개체를 선발하되 성별로 평균체중의  $\pm 20\%$  범위 내에서 균일한 개체를 사용한다.

12-2-2-3. 시험군 구성

12-2-2-3-1. 대조군 : 대조군은 별도로 두지 않아도 된다.

12-2-2-3-2. 투여군 : 10마리(암수 각 5마리 이상)이상으로 한다.

12-2-2-4. 시험물질 투여

12-2-2-4-1. 고상인 경우는 2,000 mg/kg(체중), 액상인 경우는 4,000mg/kg(체중)을 처리하되 약제의 특성상 처리가 불가능할 경우에는 처리약량을 감량하며, 시험결과 시험동물의 치사율이 50%미만인 경우에는 그 이상의 시험 수준 설정은 생략한다. <개정 2023.10.11.>

12-2-2-4-2. 용매의 선택 : 원제에 사용하는 용매는 미생물이 적절한 기주체 내에서 생존, 발아, 탈피 혹은 감염능을 유지할 수 있는 것이어야 한다. 품목의 경우는 실제 농약 살포시 사용하는 물질(예:물)과 동일한 것으로 한다.

12-2-2-4-3. 투여용량 : 1회에 투여할 수 있는 최대용량은 동물의 크기에 따라서 다르나 설치류에 있어서는 개체당 2ml를 초과하지 않는 범위내에서 투여용량의 변동폭을 최소화하여야 한다.

12-2-2-4-4. 투여방법 : 투여 24시간 전에 체표의 10%이상 털을 제거하고 시험물질은 피부와 잘 접촉되도록 다공성 거즈와 비자극성테이프로 덮는다. 노출 24시간 후 증류수로 시험물질을 세척한다.

12-2-2-5. 시험기간 : 투여 후 14일간 실시하여야 하며, 단 독성증상발현 및 소실시기 그리고 시험동물의 사망시간에 따라 시험기간을 달리할 수 있다.

12-2-2-6. 조사항목

12-2-2-6-1. 임상관찰 : 증상의 종류, 발현정도, 진행상황 및 가역성을 경시적으로 관찰, 기록한다. 최소한 매일 1회 이상 임상증상을 면밀히 관찰하여야 한다. 도포직후 및 매일 피부 홍반, 부종 등의 증상을 관찰한다.

12-2-2-6-2. 체중측정 : 투여 직전, 투여 후 주 1회, 시험종료시 또는 시험중 사망시에 측정한다.

12-2-2-6-3. 육안적 병리소견 : 독성학적 영향을 보이는 경우 모든 시험동물을 부검하여야 하고 이 경우 모든 육안적 병리 소견을 기록하여야 한다.

### 12-2-3. 급성호흡기투여독성/병원성시험

12-2-3-1. 시험물질 : 원제

12-2-3-2. 시험동물

12-2-3-2-1. 동물종 : SPF 랫드의 사용을 원칙으로 하며 일반적으로 독성시험에 광범위하게 사용되는 계통을 선정한다. 랫드 이외의 다른 포유동물종을 사용하였을 경우에는 그 선정사유를 명기하여야 한다.

12-2-3-2-2. 연령 : 건강하고 성숙된 동물로서 임신 및 출산경험이 없는 개체를 선발하되 성별로 평균체중의  $\pm 20\%$  범위내에서 균일한 개체를 사용한다.

12-2-3-3. 시험군 구성

12-2-3-3-1. 대조군 : 대조군(용매대조군 및 비투여대조군)은 군당 암수 각 2마리 이상으로 한다. 용매의 독성이 알려져 있지 않은 경우를 제외하고는 용매대조군을 별도로 두지 않아도 된다.

12-2-3-3-2. 투여군 : 중간부검군(3개군 - 투여 후 3일, 7일 및 14일) 및 최종부검군을 두되 군당 암수 각 3마리 이상으로 한다.

12-2-3-4. 시험물질 투여

12-2-3-4-1. 투여농도 : 투여농도는 개체당  $10^8$ 단위에 해당하는 미생물농약을 투여한다. 만약 이보다 낮은 단위로 투여할 경우 그 정당성 혹은 타당성이 제시되어야 한다.

12-2-3-4-2. 용매의 선택 : 원제에 사용하는 용매는 미생물이 적절한 기주체내에서 생존, 발아, 탈피 또는 감염능을 유지할 수 있는 것이어야 한다.

12-2-3-4-3. 투여용량 : 1회에 투여할 수 있는 최대용량은 동물의 크기에 따라서 다르나 설치류에 있어서는 체중 100g당 0.3ml를 초과하지 않는 범위내에서 투여용량의 변동폭을 최소화하여야 한다.

12-2-3-4-4. 투여방법 : 1회에 한하여 시험물질을 동물의 기관내 또는 비강내로 투여한다.

12-2-3-5. 시험기간 : 투여 후 21일간 실시함을 원칙으로 하나, 단 동물체내 미생물의 잔존여부, 독성·병원성 발현 및 소실시기 그리고 시험동물의 사망시간에 따라 시험기간을 달리할 수 있다.

12-2-3-6. 조사항목

12-2-3-6-1. 임상관찰 : 증상의 종류, 발현정도, 진행상황 및 가역성을 경시적으로 관찰, 기록한다. 최소한 매일 1회 이상 임상증상을 면밀히 관찰하여야 한다.

- 12-2-3-6-2. 체중측정 : 투여 직전, 투여 후 주 1회, 부검시 또는 시험중 사망시에 측정한다.
- 12-2-3-6-3. 육안적 병리소견 : 시험중에 빈사 또는 사망한 동물은 사망 즉시 부검하고, 사망일시 및 부검소견을 기록한다. 중간 및 최종부검시 모든 동물에 대하여 부검을 수행하여 육안적 병리소견을 기록하여야 한다.
- 12-2-3-6-4. 미생물의 체내 잔존상황 : 부검군 동물의 신장, 뇌, 간장, 폐, 비장, 혈액, 맹장, 대표적인 임파절 및 육안적 병변이 보이는 각 장기중의 미생물수를 측정한다.

#### **12-2-4. 급성정맥내독성/병원성시험**

- 12-2-4-1. 시험물질 : 원제
- 12-2-4-2. 시험동물
- 12-2-4-2-1. 동물종 : SPF 랫드의 사용을 원칙으로 하며 일반적으로 독성시험에 광범위하게 사용되는 계통을 선정한다. 랫드 이외의 다른 포유동물종을 사용하였을 경우에는 그 선정사유를 명기하여야 한다.
- 12-2-4-2-2. 연령 : 건강하고 성숙된 동물로서 임신 및 출산경험이 없는 개체를 선발하되 성별로 평균체중의  $\pm 20\%$  범위내에서 균일한 개체를 사용한다.
- 12-2-4-3. 시험군 구성
- 12-2-4-3-1. 대조군 : 대조군(용매대조군 및 비투여대조군)은 군당 암수 각 2마리 이상으로 한다. 용매의 독성이 알려져 있지 않은 경우를 제외하고는 용매대조군을 별도로 두지 않아도 된다.
- 12-2-4-3-2. 투여군 : 중간부검군(3개군 - 투여 후 3일, 7일 및 14일) 및 최종부검군을 두되 군당 암수 각 3마리 이상으로 한다.
- 12-2-4-4. 시험물질 투여
- 12-2-4-4-1. 투여농도 : 투여농도는 개체당  $10^7$  단위에 해당하는 미생물농약을 투여한다. 만약 이보다 낮은 단위로 투여할 경우 그 정당성 혹은 타당성이 제시되어야 한다.
- 12-2-4-4-2. 용매의 선택 : 원제에 사용하는 용매는 미생물이 적절한 기주체내에서 생존, 발아, 탈피 혹은 감염능을 유지할 수 있는 것이어야 한다.
- 12-2-4-4-3. 투여용량 : 1회에 투여할 수 있는 최대용량은 동물의 크기에 따라서 다르나 설치류에 있어서는 체중 100g당 0.3ml를 초과하지 않는 범위내에서 투여용량의 변동폭을 최소화하여야 한다.

- 12-2-4-5. 투여방법 : 1회에 한하여 시험물질을 동물의 정맥내에 강제 투여한다. 다만, 일시에 투여하기 어려울 경우에는 24시간 이내에 소량씩 나누어 투여할 수 있으며, 정맥내 투여가 불가능한 경우 복강내로 투여할 수 있다.
- 12-2-4-6. 시험기간 : 투여 후 21일간 실시함을 원칙으로 한다. 다만 동물체내 미생물의 잔존여부, 독성·병원성 발현 및 소실시기, 시험동물의 사망시간에 따라 시험기간을 달리 할 수 있다.
- 12-2-4-7. 조사항목
- 12-2-4-7-1. 임상관찰 : 증상의 종류, 발현정도, 진행상황 및 가역성을 경시적으로 관찰, 기록한다. 최소한 매일 1회 이상 임상증상을 면밀히 관찰하여야 한다.
- 12-2-4-7-2. 체중측정 : 투여 직전, 투여 후 주 1회, 부검시 또는 시험중 사망시에 측정한다.
- 12-2-4-7-3. 육안적 병리소견 : 시험중에 빈사 또는 사망한 동물은 사망 즉시 부검하고, 사망일시 및 부검소견 등을 기록한다. 중간 및 최종부검시 모든 동물에 대하여 부검을 수행하여 육안적 병리소견을 기록하여야 한다.
- 12-2-4-7-4. 미생물의 체내 잔존상황 : 부검군 동물의 신장, 뇌, 간장, 폐, 비장, 맹장, 대표적인 임파절 및 육안적 병변이 보이는 각 장기중의 미생물수를 측정한다.

## **12-2-5. 안점막자극성시험**

- 12-2-5-1. 시험물질 : 품목
- 12-2-5-2. 시험동물
- 12-2-5-2-1. 동물종 : 백색토끼(뉴질랜드 화이트계)의 사용을 원칙으로 한다.
- 12-2-5-2-2. 연령 및 동물수 : 건강하고 성숙된 동물(체중 2kg이 적당)로서 암컷은 임신 및 출산 경험이 없는 개체를 선발하되 평균체중의  $\pm 20\%$  범위내에서 균일한 개체를 사용하고, 최소한 3마리 이상으로 한다. <개정 2015.4.3.>
- 12-2-5-3. 시험물질 투여
- 12-2-5-3-1. 투여농도 : 투여농도는 개체당  $10^7$  단위에 해당하는 미생물농약을 투여한다. 만약 이보다 낮은 단위로 투여할 경우 그 정당성 혹은 타당성이 제시되어야 한다.
- 12-2-5-3-2. 용매의 선택 : 품목에 사용하는 용매는 실제 농약살포시 사용하는

물질(예: 물)과 동일한 것으로 한다.

12-2-5-3-3. 투여용량 : 0.1ml 또는 0.1g을 초과하지 않는 범위내에서 처리한다.

12-2-5-3-4. 투여방법 : 시험개시전 24시간 이내에 시험동물의 양쪽 눈을 검사하여 눈에 이상이 없는 동물을 사용한다. 약제처리는 한쪽 눈의 하안검(下眼瞼)을 가볍게 잡아당기고 그 결막낭내에 농약을 한번에 넣어 처리한다. 시험물질의 손실을 막기 위해 양안검(兩眼瞼)을 느슨하게 맞춰 잡고 약 1초간 유지한다. 처리하지 않은 다른 한쪽 눈은 대조로 한다. 필요시 투여 24시간 후 미온수로 세척한다.

12-2-5-4. 시험기간 : 투여 후 7일간 실시함을 원칙으로 한다.

12-2-5-5. 조사항목(임상관찰 및 안점막자극평가) : 자극증상 및 안 손상의 관찰은 투여 후 1시간, 1일, 2일, 3일, 4일 및 7일 후에 수행한다. 7일째에 자극증상이 보일 때는 그 후 3일마다 한번씩 최장 21일간 관찰한다.

## 12-2-6. 피부자극성시험

12-2-6-1. 시험물질 : 품목. 다만, 강산 또는 강알카리성 물질(pH 2 이하 또는 pH 11.5이상)의 품목은 제외한다.

12-2-6-2. 시험동물

12-2-6-2-1. 동물종 및 계통 : 백색토끼(뉴질랜드 화이트계)의 사용을 원칙으로 한다.

12-2-6-2-2. 시험동물의 연령 및 수 : 건강하고 성숙된 동물 (체중 2~3Kg가 적당)로서 최소한 3마리를 사용한다. <개정 2015.4.3.>

12-2-6-3. 처리방법

12-2-6-3-1. 시험개시 약 24시간 전에 전기 삭발기 등을 이용하여 토끼 등부위의 털을 약 15cm × 15cm의 넓이로 깎는다. 이때 등부위의 피부가 손상되지 않도록 각별히 주의해야 한다.

12-2-6-3-2. 고상 또는 paste상 농약은 중량으로 0.5g, 액상인 농약은 용량으로 0.5ml을 처리한다.

12-2-6-3-3. 고상인 농약은 물 또는 적당한 용매로 충분히 녹이거나 현탁시켜 피부에 골고루 도포한다. 다만, 용매 사용시 용매 대조구를 둘 수 있다.

12-2-6-3-4. 6cm<sup>2</sup>(2cm x 3cm)의 면적에 시험물질을 처리한 거즈(gaze)로 덮고 피부에 자극이 없는 테이프로 고정시킨다. 이 경우 토끼가 시험물질을 섭취하거나 흡입하지 못하도록 하여야 한다. <개정 2015.4.3.>

12-2-6-3-5. <삭제 2015.4.3.>

12-2-6-3-6. 노출시간은 4시간이며, 노출시간 종료시 남아 있는 시험물질은 물 또는 적당한 용매를 이용하여 제거한다.

12-2-6-4. 임상관찰과 채점 : 동물은 노출 종료후 30~60분, 24, 48, 및 72시간에 홍반과 가피형성 그리고 부종의 정도를 관찰하고 다음의 평가표에 따라 채점하여 기록한다. 필요시 자극의 가역성 또는 비가역성을 판별하기 위해 72시간 후에도 관찰을 계속할 수 있으나 일반적으로 14일을 초과할 필요는 없다. 피부 자극성 이외에도 특이한 장애나 기타 중독증상 등을 보일 때에는 이를 자세히 기록한다.

<피부반응의 평가>

1) 홍반과 가피형성 .....	평점
○ 홍반이 전혀 없음 .....	0
○ 아주 가벼운 홍반(육안으로 겨우 식별할 정도) .....	1
○ 분명한 홍반 .....	2
○ 약간 심한 홍반 .....	3
○ 심한 홍반(홍당무색의 발적)과 가벼운 정도의 가피 .....	4
최고점=4	
2) 부종형성 .....	평점
○ 부종이 전혀 없음 .....	0
○ 아주 가벼운 부종(육안으로 겨우 식별할 정도) .....	1
○ 가벼운 부종(뚜렷하게 부어올라서 변연부(경계부위)가 분명히 구별될 수 있을 정도)	2
○ 보통의 부종(약 1mm 정도 부어오른 상태) .....	3
○ 심한 부종 (1mm이상 부어오르고 노출부위 밖에까지 확장된 상태) .....	4
최고점=4	

12-2-6-4-1. 피부반응의 가역성은 자극반응 평가 시 고려되어야 한다. 즉, 탈모증, 과각화증 등의 이상증상이 14일간 지속될 경우 해당 시험물질은 자극성이 있는 것으로 판정한다.

### 12-2-7. 피부감작성시험

12-2-7-1. 시험물질 : 품목

12-2-7-2. 시험동물

12-2-7-2-1. 동물종 : 백색 기니픽을 사용한다.

12-2-7-2-2. 연령 : 건강하고 성숙된 동물로서 300~400g의 개체를 선발하되 평균체중의 ±20% 범위내의 균일한 개체를 사용한다.

12-2-7-3. 시험군 구성

12-2-7-3-1. 대조군 : 대조군(비투여대조군 및 양성대조군)은 수컷으로 5마리

이상 사용하며, 양성대조군은 알러지를 일으키는 것으로 알려진 물질을 사용한다.

12-2-7-3-2. 투여군 : 수컷으로 군당 10마리 이상 사용한다.

12-2-7-4. 시험물질 투여 : 시험동물의 털을 제거하고, 1회 투여시 개체당 0.05 ml를, 그 후에는 2일 간격으로 0.1ml씩 3주간 9번 피내주사하고, 10회 주사 2주후에 야기주사를 실시한다.

12-2-7-5. 시험기간 : 투여개시부터 야기투여 후 48시간까지 실시함을 원칙으로 한다.

12-2-7-6. 조사항목 : 투여 후 24, 48시간 후 홍반, 부종 등의 피부반응을 조사한다.

### **12-2-8. 반복투여경구독성시험 <개정 2010.2.9.>**

12-2-8-1. 시험물질 : 원제

12-2-8-2. 시험동물

12-2-8-2-1. 동물종 : 급성독성 시험에서 사용한 것과 같은 종을 사용한다.

12-2-8-2-2. 연령 : 건강하고 성숙된 동물로서 임신 및 출산경험이 없는 개체를 선발하되 성별로 평균체중의  $\pm 20\%$  범위내에서 균일한 개체를 사용한다.

12-2-8-3. 시험군 구성

12-2-8-3-1. 대조군 : 비투여대조군은 암수 각 10마리 이상으로 한다. 용매대조군은 용매의 독성이 알려져 있지 않은 경우를 제외하고는 별도로 두지 않아도 된다.

12-2-8-3-2. 투여군 : 암수 각 10마리 이상으로 한다.

12-2-8-4. 시험물질 투여

12-2-8-4-1. 투여농도 : 투여농도는 개체당  $10^8$ 단위에 해당하는 미생물농약을 투여한다. 만약 이보다 낮은 단위로 투여할 경우 그 정당성 혹은 타당성이 제시되어야 한다.

12-2-8-4-2. 투여방법 : 급성독성/병원성시험에서 감염성 또는 잔존성이 인정된 투여경로로 매일 1회씩 투여한다.

12-2-8-5. 시험기간 : 1개월 이상 실시한다.

12-2-8-6. 조사항목

12-2-8-6-1. 임상관찰 : 증상종류, 발현정도, 진행상황 및 가역성을 경시적으로 관찰, 기록 한다. 관찰기간은 1개월 이상으로 하며, 주 1회 사료 및 물 섭취량을 기록한다.

12-2-8-6-2. 체중측정 : 투여 직전, 투여 후 주 1회, 시험종료시 또는 시험중 사

망시에 측정한다.

12-2-8-6-3. 육안적 병리소견 : 시험중에 빈사 또는 사망한 동물은 사망 즉시 부검하고 사망시간 및 부검소견 등을 기록한다. 시험종료시 모든 동물에 대하여 부검을 수행하여 육안적 병리소견을 기록하여야 한다.

12-2-8-6-4. 미생물의 체내 잔존상황 : 시험중 사망한 동물과 시험종료시 모든 동물의 신장, 뇌, 간장, 폐, 비장, 위장, 혈액, 맹장, 대표적인 임파절 및 육안적 병변이 보이는 각 장기중 미생물수를 측정한다.

### **12-2-9. 유전독성시험 <개정 2010.2.9.>**

12-2-9-1. 시험물질 : 원제

12-2-9-2. 시험방법 : 감염성이 인정되는 진균의 지용성추출물을 대상으로 하며 유전자이상시험, 배양세포를 이용한 염색체이상시험, 설치류를 이용한 생체내 영향시험을 「농약의 등록시험기준과 방법」에 준하여 실시한다.

### **12-2-10. 번식수정영향시험 <개정 2010.2.9.>**

12-2-10-1. 시험물질 : 원제

12-2-10-2. 시험동물

12-2-10-2-1. 동물종 : SPF 랫드 또는 마우스 사용을 원칙으로 하며 일반적으로 독성시험에 광범위하게 사용되는 계통을 선정한다. 랫드 이외의 다른 포유동물종을 사용하였을 경우에는 그 선정사유를 명기하여야 한다.

12-2-10-2-2. 연령 : 6~8주령으로 건강하고 성숙된 동물로서 임신 및 출산경험이 없는 개체를 선발하되 성별로 평균체중의  $\pm 20\%$  범위내에서 균일한 개체를 사용한다.

12-2-10-3. 시험군 구성

12-2-10-3-1. 대조군 : 비투여대조군은 암수 각 20마리 이상 사용하여 임신동물수가 20마리 이상 되도록 한다. 용매대조군은 용매의 독성이 알려져 있지 않은 경우를 제외하고는 별도로 두지 않아도 된다.

12-2-10-3-2. 투여군 : 암수 각 20마리 이상 사용하여 임신동물수가 20마리 이상 되도록 한다.

12-2-10-4. 시험물질 투여

12-2-10-4-1. 투여농도 : 투여농도는 개체당  $10^8$  단위에 해당하는 미생물농약을 투여한다. 만약 이보다 낮은 단위로 투여할 경우 그 정당성 혹은 타당성이

제시되어야 한다.

12-2-10-4-2. 용매의 선택 : 원제에 사용하는 용매는 미생물이 적절한 기주체내에서 생존, 발아, 탈피 혹은 감염능을 유지할 수 있는 것이어야 한다.

12-2-10-4-3. 투여용량 : 1회에 투여할 수 있는 최대용량은 동물의 크기에 따라서 다르나 설치류에 있어서는 체중 100g당 1ml를 초과하지 않는 범위내에서 투여용량의 변동폭을 최소화하여야 한다.

12-2-10-4-4. 투여방법 : 경구투여를 원칙으로 하되, 급성호흡기투여독성 시험결과 기도에 대한 영향이 인정되는 경우 기도로 투여하여 시험한다.

12-2-10-5. 시험기간 : 투여시부터 신생자의 부검시까지 실시한다.

12-2-10-6. 조사항목

12-2-10-6-1. 임상관찰 : 증상의 종류, 발현정도, 진행상황 및 가역성을 관찰, 기록한다. 관찰기간은 통상 투여시부터 신생자의 부검시까지로 한다. 또한 임신한 암컷에 대해서는 사료섭취량과 임신경과, 임신기간의 연장유무, 분만직후의 신생자에 대해서는 체중, 사산자수, 생산자수, 신생자의 외관이상 등을 관찰하여 기록한다.

12-2-10-6-2. 체중측정 : 투여 직전, 투여 후 주 1회, 시험종료시 또는 시험중 사망시에 측정한다.

12-2-10-6-3. 육안적 병리소견 : 수컷은 암컷의 임신이 확인되면 부검하며 암컷은 분만 후 될 수 있는 한 신속히 부검한다. 신생자는 분만 다음날 부검한다.

12-2-10-6-4. 미생물의 체내 잔존상황 : 부검된 모든 동물의 장기 조직, 혈액중의 미생물수를 측정한다. 단, 임신지수는 다음의 교미율, 임신율, 출산율을 의미하며 다음의 공식에 의하여 구한다. <개정 2010.2.9.>

$$\begin{aligned} \text{교미율} &= \text{교미한 동물수} / \text{교배에 이용한 동물수} \times 100 \\ \text{임신율} &= \text{임신한 동물수} / \text{교미한 암컷수} \times 100 \\ \text{출산율} &= \text{생존자를 출산한 암컷수} / \text{임신한 동물수} \times 100 \end{aligned}$$

## 12-2-11. 발암성시험

12-2-11-1. 시험물질

12-2-11-1-1. 발암성 의심 바이러스

12-2-11-1-2. 발암성 바이러스와 근연관계가 있는 바이러스

12-2-11-1-3. 세포배양시험에서 포유동물세포에 대한 형질전환성이 인정되는 바이러스

12-2-11-1-4. 전항에 해당하는 바이러스가 해당 미생물농약중에 혼입되어 있을 가능성이 있는 경우

12-2-11-2. 시험방법 및 조사항목 : 국제적으로 통용되는 농약의 발암성시험기준과 방법에 준하여 실시한다.

### **12-2-12. 면역독성 시험**

12-2-12-1. 시험물질

12-2-12-1-1. 세포배양시험에서 포유동물세포에 감염성이 인정되는 바이러스

12-2-12-1-2. 포유동물의 면역계에 감염이나 병변을 일으키고, 면역부전상황을 유발하는 것으로 알려져 있는 바이러스와 근연관계가 있는 바이러스

12-2-12-2. 시험방법 및 조사항목 : 국제적으로 통용되는 농약의 면역독성 시험기준과 방법에 준하여 실시한다.

### **12-2-13. 세포배양시험**

12-2-13-1. 시험물질 : 유효물질이 바이러스인 원제

12-2-13-2. 시험방법

12-2-13-2-1. 세포주

12-2-13-2-1-1. 사람 태아초기세포

12-2-13-2-1-2. 사람 2배체 세포주

12-2-13-2-1-3. 영장류 유래 주화세포

12-2-13-2-1-4. 시리안 햄스터 태자(SHE)세포

12-2-13-2-1-5. 해당 바이러스의 증식과 정량을 통하여 얻은 감수성 세포주

12-2-13-2-2. 감염성시험 : 배양접시당  $10^6$  단위의 바이러스를 접종하여 접종 후 7일, 14일에 계대배양하고, 21일 동안 매일 세포변성을 관찰한다. 본 시험에는 세포당 최저 5 Plaque-forming units(PFU)또는 7 LD<sub>50</sub>단위(숙주곤충에 대한 LD<sub>50</sub>을 1단위)의 바이러스를 사용한다. 만약 이보다 적은 단위를 사용하는 경우 그 정당성 혹은 타당성을 제시해야 한다. 또한 접종 1일, 2일, 5일, 7일 14일, 21일 후에 배양액을 회수하여 바이러스를 정량하고 21일 후에 세포중의 바이러스 항원 및 핵산을 정량한다. 대조군으로서 비접종군, 불활성화 대조군, 양성대조군을 설정한다

12-2-13-2-3. 세포독성 시험 : 전항의 배양세포를 각각 200개씩 30개의 배양접시에 분주하여 배양하고, 24시간 후에 개당  $10^5$  단위의 바이러스를 10개에 접종

하고, 다른 10개에는 바이러스액을 구성하고 있는 비척추동물세포용 배양액을 동량 가한다. 나머지 10개는 비접종대조군으로 한다. 시험에는 세포당 최저 5 PFU 또는 7 LD<sub>50</sub> 단위의 바이러스를 사용한다. 만약 이보다 적은 단위를 사용하는 경우에는 그 정당성 혹은 타당성을 제시하여야 한다. 비접종대조군에 작은 집락이 나타나는 시간동안 배양하고 위 3개 시험군에 있어서 각 세포주의 집락형성에 대한 영향을 관찰한다.

12-2-13-2-4. 세포형질전환시험 : 감염성시험에서 바이러스 핵산이 세포내에 확인된 경우에 실시한다. SHE 세포에 바이러스를 접종하고 형질전환 유무를 관찰한다. 대조군으로 비접종군, 불활성화대조군, 양성대조군[SHE세포에 Simian adenovirus - 7형(SAV-7)을 접종한 군]을 설정한다. 형질전환이 인정되는 경우에는 형질전환이 인정되는 집락의 세포를 햄스터에 접종하여 종양형성 유무를 확인한다.