

# 화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인(Ⅲ) - BCOP 시험법 - (Bovine Corneal Opacity and Permeability test)

2011.06.



## I. 서론

### 1. 배경

가. 화장품 안전성 평가에 있어 국제적으로 동물대체시험법의 요구가 높아지고 있으며, 유럽에서는 화장품 안전성 평가 시 실험동물 이용을 금지시키는 법안이 통과됨

나. 화장품 산업이 급속하게 과학화, 국제화가 추진되고 있어 화장품에 대한 과학적이고 효율적인 안전성 평가방법의 가이드라인이 요구됨.

다. 이에 따라 화장품의 안전성 평가 시 국제적으로 대두되고 있는 동물대체시험법을 고려하여 동물대체시험법에 대한 가이드라인을 제정하고자 함.

### 2. 목적

가. 국제적 추세에 맞는 과학적이고, 객관적인 동물대체시험법을 제시함으로써 화장품 안전성 평가에 기여하고,

나. 표준화된 동물대체시험법 가이드라인의 제시로 화장품업계 및 독성시험 연구기관의 국제 경쟁력을 향상시키고자 함.

## II. 개요

1. 이 시험은 실험물질이 U.S. Environmental Protection Agency (EPA), U.S. Environmental Protection Agency (EU), (Category R41), United Nations (UN), Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) (Category 1)에 의해 정의된 “눈에 부식성이 있고, 자극이 심한 물질”인지 여부를 판정하는 in vitro 시험이다<sup>(1) (2) (3)</sup>. “심한 자극물질”이란 토끼 눈에 처치 후 최소 21일간 지속되는 병변을 유발하는 물질을 말한다.

2. 이 시험법은 토끼를 이용한 안점막자극시험의 대체시험으로 사용될 수 없다. 그러나, 제도적으로 정해진 분류 및 표시를 위한 ‘단계적 전략’으로 유용하다<sup>(4) (5)</sup>. 이 시험의 의의는 실험물질 (단일물질 또는 제제)이 눈에 부식성이 있거나 자극이 심한 물질인 경우 더 이상 토끼에 시험하지 않아도 된다는데 있다<sup>(6)</sup>. 다만, 이 시험에서 음성으로 판정된 물질 OECD 시험 가이드라인 405 등 안점막 자극시험을 하여 최종 판정을 하여야 한다<sup>(7)</sup>.

3. 이 가이드라인은 소 각막의 혼탁 유발 및 투과성 증가를 측정함으로써 눈에 부식성이 있거나 심한 자극을 유발할 가능성이 있는 실험물질을 평가하는 과정을 포함하고 있다. 각막에 대한 독성은 (i) 빛의 투과도 감소(혼탁도)와 (ii) 플루오레세인나트륨의 투과도의 증가(투과도)에 의해 평가된다. 실험물질의 안점막자극은 측정된 혼탁도와 투과도를 가지고 계산된 IVIS (In Vitro Irritancy Score)로 표시되며, IVIS는 실험물질의 자극 정도를 분류하는데 사용된다.

4. 21일 내에 해소되는 병변을 유발하는 자극물질이나 비자극물질들 또한 이 시험 방법에 의해 평가되어져 왔다. 하지만 EPA (15), EU (26), GHS (3) 에 의해 정의되어 분류된 물질들의 BCOP 시험에 대한 정확도와 신뢰성은 아직 정식으로 평가되지 않았다.

## III. 용어정의

1. 정확성 : 측정치가 참값에 근접해 있는 정도
2. 기준물질 : 이 물질은 비교의 기준으로 사용한다. 기준물질로 갖춰야 할 속성은 다음과 같다. (i) 반응의 일관성 (ii) 구조적, 기능적 유사성 (iii) 물리·화학적 특성 (iv) 효과 입증 자료 (v) 충분한 효력
3. 각막 : 홍채와 동공을 덮고 있고, 빛을 통과시키는 안구전면의 투명한 부분
4. 각막혼탁도 : 실험물질에 의한 각막의 불투명정도. 각막 혼탁도 증가는 각막 손상 정도를 나타낸다. 각막 혼탁도는 Draize법처럼 주관적으로 평가하거나, opacitometer와 같은 기구를 이용하여 객관적으로 측정할 수 있다.

5. 각막투과도 : 각막 상피의 손상을 정량적으로 측정할 수 있는 지표로 각막층을 통과하는 플루오로세인나트륨용액의 양을 측정함으로써 산출할 수 있다.

6. EPA Category 1 : 부식 (안구 조직의 비가역적인 파괴) 또는 21일 이상 지속되는 각막의 자극 (1)

7. EU Category R41 : 21일 이상 지속되는 눈의 조직 손상, 또는 시력의 심각한 손상 (2)

8. 위음성률 : 음성으로 판정되는 모든 양성물질의 비율.

9. 위양성률 : 양성으로 판정되는 모든 음성물질의 비율.

10. GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) : 사람(고용주, 작업자, 운반인, 소비자 및 응급처치자) 과 환경을 보호하기 위해 전세계적으로 표준 유형 및 물리적, 보건 및 환경 위험에 따라 화학물질 (순물질과 혼합물)의 위험성을 분류하고 통일된 형태의 경고표지 및 안전정보를 전달하는 방법

11. GHS Category 1 : 21일 내에 완전히 되돌릴 수 없는 눈의 조직 손상, 또는 시각 신경계의 심각한 물리적 부식 유발 (3).

12. IVIS (In Vitro Irritancy Score): BCOP 시험에 사용되는 공식. 각 처치군에서 산출된 평균 혼탁도와 투과도 값은 이 공식에 의하여 하나의 in vitro 점수 산출된다. IVIS= 평균 혼탁도+ (15 x 평균 투과도)

13. 음성대조군 : 다른 시험의 구성요소의 영향을 알아보기 위한 아무것도 처치하지 않은 군. 용매가 시험의 구성요소에 미치는 영향을 알아보기 위해 사용된다.

14. 비자극 : EPA Category I, II, 또는 III; EU Category R41 or R36; 또는 GHS Category 1, 2A, 또는 2B ocular irritants 로 분류되지 않은 물질

15. 부식 : (a) 눈에 비가역적 조직 손상을 일으키는 물질 (b) GHS Category 1, EPA Category I, or EU Category R41 ocular irritants 으로 분류된 물질이다 (1) (2) (3).

16. 자극 : (a) 눈에 비가역적 변화를 일으키는 물질 (b) EPA Category II or III, EU Category R36, or GHS Category 2A or 2B ocular irritants 로 분류되는 물질이다 (1) (2) (3)

17. 심각한 자극 : (a) 21일 이내 해결될 수 없거나 눈에 심각한 물리적 부식을 일으켜 비가역적인 조직 손상을 일으키는 물질 (b) GHS Category 1, EPA Category I, or EU Category R41 ocular irritants 로 분류되는 물질 (1) (2) (3)

18. Opacitometer : 각막을 투과하는 빛의 정도를 측정함으로써 “각막의 불투명도”를 측정하는데 사용하는 기계.

19. 양성 대조군 : 시험의 모든 구성요소를 포함하고 양성 반응을 유도한다고 알려진 물질을 처치한 것. 시간에 따른 반응 정도를 평가하기 위해 사용.

20. 신뢰성 : 동일한 실험방법을 이용하여 수행된 경우 시간과 장소가 상이하더라도 재현이 가능하여야 한다. 이것은 실험실 내, 실험실간 재현성 및 실험실내 반복성으로 평가한다.

21. 용제·용매 대조군 : 용제·용매의 시험에 미치는 영향을 알아 보기 위해 용질만을 뺀 나머지를 처치한 군.

22. 단계적 시험 : 시험물질에 대한 기존의 모든 정보를 검토하는 단계적인 테스트 전략, 지정된 순서대로, 충분한 정보가 위험 분류 결정에 사용할 수 있는 경우 각각의 계층에 증거를 사용하여 다음 단계로 진행하기 전에 확인하여야 한다.

#### IV. 유의사항

1. 지금까지 알려진 바에 따르면 알콜류와 케톤류에서 높은 위양성률과 고체물질에서의 높은 위음성률이다<sup>(6)</sup>. 이런 물질들이 제외된다면, EU, EPA, GHS 분류에 따른 BCOP 결과의 정확성은 매우 증가한다<sup>(6)</sup>. 이 시험에서 사용된 실험물질이 양성을 나타낸다면, 그것은 그 물질이 눈에 부식성 또는 심각한 자극을 줄 수 있음을 나타낸다. 다만, 알콜류나 케톤류에서 얻어진 양성 결과는 정확하지 않을 수 있으므로 주의하여야 한다.

2. 소의 눈과 각막을 이용하는 모든 과정은 실험 시설에서 적용 가능한 규정 및 조직이나 조직액을 포함한 동물 유래의 물질을 다룰 때의 과정을 준수해야 한다<sup>(12)</sup>.

3. BCOP 시험은 눈에 대한 자극의 정도는 판정할 수 있으나 결막과 홍채에 대한 손상은 알 수 없는 한계가 있다. 또한, BCOP 시험법 자체로는 각막손상의 가역성을 판정할 수 없지만, 토끼의 눈 실험과 병행하게 되면 최초 각막 손상 깊이 측정을 통해 비가역성과 가역성을 구별할 수 있다고 알려져 있다<sup>(13)</sup>. 마지막으로 이 시험은 눈을 통한 노출을 통해 전신 독성 가능성을 평가할 수는 없다.

4. 이 시험법을 사용하여 물질 분류 자료로 사용하고자 하는 경우에는 붙임1을 참고하여 숙련도를 입증하여야 한다.

#### V. 시험의 원칙

1. 이 시험에서 실험물질에 의한 손상은 opacitometer와 분광광도계를 이용하여 각막의 혼탁도와 투과도를 정량적으로 측정할 수 있다. 두 측정값은 모두 IVIS 산출을 위해 사용된다.

2. 각막은 갓 도살된 소에서 추출한 눈의 각막을 사용한다. 각막의 혼탁도는 각막을

통과하는 빛의 양을 측정하여 정량적으로 나타낼 수 있다. 투과도는 각막을 통과하여 후방 챔버의 배지로 이동한 플루오로세린나트륨의 양으로서 나타낼 수 있다. 시험에 사용되는 각막 홀더는 붙임 2과 같다.

#### 3. 소의 선택

○ 식재료로 적합한 건강한 소에서 나온 각막을 사용한다. 소는 종, 나이, 성별에 따라 광범위한 체중을 가지므로, 도살 당시 추천되는 체중은 없다.

○ 각막의 지름은 동물의 연령에 따라 다를 수 있다. 8년령 이상 소의 경우, 각막의 수평 기준 지름(horizontal diameter)은 30.5mm 이상이고 각막의 중심 두께 (central corneal thickness; CCT)는 1100 $\mu$ m 이상이다. 5년령 이하 소의 경우, 수평 기준 지름은 28.5mm 이하이고 CCT는 900 $\mu$ m 이하이다<sup>(14)</sup>. 이런 이유로 60개월령 이상 소에서 추출한 눈은 사용하지 않는다. 12개월령 이하의 소에서 추출한 눈도 통상적으로 사용하지 않는데, 이는 눈이 발달하는 중에 있고 각막의 두께와 지름이 성우(成牛)보다 작다고 보고되어 있기 때문이다. 그러나 어린 동물 (6~12개월)의 각막은 광우병 노출에 대한 가능성의 감소 등의 이점이 있다.<sup>(15)</sup> 실험에 사용되는 소의 추정나이와 몸무게를 함께 보고하여야 한다.

#### 4. 눈의 추출과 운반

○ 눈은 도살장 작업자에 의해 추출된다. 눈의 기계적 손상과 기타 손상을 최소화하기 위하여 도살 후 최대한 빨리 추출되어야 한다. 자극성이 있는 물질이 눈에 노출되는 것을 막기 위하여 도살장의 직원들은 동물의 머리를 세척할 때 가급적 세제를 사용하지 않도록 한다.

○ 눈은 변질 및 (또는) 세균 오염을 최소화하기 위해 적절한 크기의 상자에 들어있는 HBSS(Hanks' Balanced Salt Solution)에 완전히 담근 채로 운반하여야 한다. 도살과정 중에 혈액이나 다른 생물학적 물질 (세균과 다른 미생물들) 등에 노출될 수 있다. 따라서 오염을 최소화하는 것이 매우 중요하다. 이를 위해 눈을 담은 상자를 얼음박스에 넣고 HBSS에 100IU/mL의 페니실린과 100ug/mL 스트렙토마이신 (streptomycin)를 첨가한다.

○ 눈의 추출과 각막의 사용 시점사이의 시간 간격을 최소화하여야 하며 (보통 동일한 날 추출하여 사용한다.), 이 간격이 결과에 영향을 미치지 않았음이 입증되어야 한다. 한 실험에 쓰이는 모든 눈은 같은 날 추출되어야 한다.

#### 5. 눈의 선별 기준

○ 실험실에 눈이 도착하면 혼탁도의 증가 여부, 상처, 신생혈관생성 등을 주의 깊게 살펴야 한다. 이와 같은 결함이 없는 각막만 사용할 수 있다.

○ 각막의 질은 다음 과정을 통해 평가한다. 1시간의 순응기를 거친 후, 혼탁도가 7을 초과하는 각막은 제외되어야 한다 (주의: 교정된 opacitometer 사용)

○ 각 군 (실험군, 음성대조군, 양성대조군)은 최소 3개의 각막으로 구성된다. 모든 각막은 안구에서 적출하여 각막 챔버에 고정되므로, 각각의 각막을 다루는 과정에서 혼탁도와 투과도의 오류가 발생할 수 있다. 따라서, 음성대조군에서 얻은 혼탁도와 투과도는 실험물질과 양성대조물질 처리 후 각막의 투과도와 혼탁도의 IVIS 계산 시 보정을 위해 사용된다.

## 6. 시험방법

### □ 각막준비

○ 손상이 없는 것이 확인된 각막을 공막을 약 2~3mm 정도 포함하여 상피와 내피가 손상되지 않도록 주의하면서 자른다.

○ 홀더의 상방 및 하방 양쪽 챔버에 미리 32℃로 데워진 EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium)을 후방부터 거품이 생기지 않도록 주의하며 먼저 채운다.

○ 분리한 각막을 전방홀더에는 각막의 상피가 후방홀더에는 각막의 내피가 위치하도록 홀더에 장착한다.

○ 이 홀더를 각막이 배지에 적용하여 정상 대사 활동을 할 수 있도록 32±1℃에서 최소 1시간동안 배양한다 (참고 : 생체에서 각막 표면은 대략 32℃이다.).

○ 적용기 이후, 미리 32℃로 맞춰진 새 EMEM을 양쪽 챔버에 채워 혼탁도의 기저값을 측정한다.

○ 육안적 조직 손상 (긁힘, 색소침착, 신생혈관형성)이나 혼탁도 7을 초과하는 각막은 버린다.

○ 각막의 혼탁도를 측정하여 중앙값에 가까운 혼탁도를 가진 각막 중 최소 3개를 음성대조군으로 한다. 남은 각막들은 실험군과 양성대조군으로 사용한다.

○ 물은 공기보다 비열이 크기 때문에, 배양에 필요한 온도를 더 안정적으로 제공한다. 따라서 온도 유지를 위해 32±1℃로 유지된 수조를 사용하는 것이 좋다. 그러나 공기 배양기도 사용가능하며, 이 때 안정적 온도를 유지하는데 주의를 기울여야 한다. (예, 미리 홀더 및 배지의 온도를 32±1℃로 조정).

### □ 실험물질의 적용

#### ○ 실험물질 적용 방법

- 액체, 반고체, 크림, 왁스 및 계면활성화제 (고체 또는 액체) : 액체, 반고체, 크림 및 왁스는 희석하지 않고 적용하며, 계면활성제는 0.9% 염화나트륨용액이나 증류수 또는

실험계에 영향을 미치지 않는 용매에 10 w/v% 농도로 희석하여 적용한다. 적용시간은 10분으로 한다. 희석방법 및 적용시간을 다르게 할 경우 이에 대한 충분한 과학적 근거를 확보하여야 한다.

- 비계면활성고체물질 : 일반적으로 0.9% 염화나트륨용액이나 증류수 혹은 실험계에 영향을 미치지 않는 용매에 20% 농도로 희석한 용액이나 현탁액 상태로 적용한다. 과학적 타당성이 있는 경우 고체는 개방형 챔버를 이용하여 직접 적용할 수 있다. 적용시간은 4시간으로 한다. 적용시간을 다르게 할 경우 이에 대한 충분한 과학적 근거가 있어야 한다.

○ 실험물질 적용 시 챔버 개폐여부 : 이 선택에 있어서 가장 중요한 고려사항은 실험물질이 각막 표면 전체에 적용될 수 있는지 여부와 세척과정에서 실험물질의 완전하게 제거될 수 있는지 여부이다.

- 폐쇄형 챔버법 : 일반적으로 점성이 없거나 약간 점성이 있는 액체물질 적용 시 사용된다. 상단 챔버의 구멍을 통해 각막 상피층으로 충분한 양 (약 750μL)의 실험물질이 투여되고, 적용시간동안 구멍은 막개를 이용하여 막아둔다. 실험물질이 규정된 시간만큼 충분히 적용되어야 한다.

- 개방형 챔버법 : 일반적으로 반점성에서 점성의 액체와 고체 적용 시 사용된다. 실험 전에 상단 챔버의 잠금쇠 링과 유리를 제거하고 마이크로피펫을 이용하여 대조물질이나 실험물질 (750μL, 또는 각막을 덮을 수 있는 충분한 양)을 각막 상피 표면에 직접 적용한다. 피펫으로 적용이 어려운 물질의 경우, 포지티브 디스플레이스먼트 피펫으로 적용할 수 있다. 실험물질을 취할 때 공기방울이 혼입되지 않도록 주의한다. 필요하면 주사바늘을 제거한 주사기를 사용할 수 있다. 적용 후 챔버에 유리를 장착하여 폐쇄한다.

### □ 적용 후 배양

○ 적용 후, 실험물질, 음성대조물질 또는 양성대조물질을 상단 챔버에서 제거하고, 각막 상피를 최소 3번 (또는 육안으로 적용물질이 관찰되지 않을 때까지) 페놀레드가 포함된 EMEM으로 세척하여 준다. 이는 페놀레드의 색변화로 산성 또는 염기성 물질 제거 여부를 확인할 수 있기 때문이다. 페놀레드의 색깔이 노란색 또는 보라색으로 변하거나, 적용 물질이 여전히 보인다면 각막을 세 번 더 세척해 준다. 적용물질이 배지에 남아 있지 않다고 판단되면 마지막으로 페놀레드가 포함되지 않은 EMEM으로 각막을 세척한다. 페놀레드가 포함되지 않은 EMEM은 혼탁도 측정 전에 상단챔버의 페놀레드를 제거하기 위해 마지막 세척과정에 사용한다. 마지막 세척 후 상단챔버를 페놀레드가 없는 EMEM으로 다시 채운다.

○ 액체나 계면활성제의 경우 세척 후 각막을 2시간 동안 32±1℃에서 추가 배양한다.

경우에 따라서는 배양 시간이 더 길수록 유의할 수 있으므로 상황에 따라 적절한 시간 동안 배양한다. 고체를 적용한 각막은 4시간 적용 후에 완전히 세척한 후 추가 배양은 하지 않는다.

○ 액체와 계면활성제는 적용과 추가 배양 후에, 그리고 비계면활성고체는 4시간 적용 후에 혼탁도와 투과도를 측정한다. 이때 각 각막을 육안적으로 관찰하고 관찰 사항을 기록한다 (예, 조직의 벗겨짐, 남은 실험물질, 균질하지 않은 혼탁도). 이런 관찰사항은 opacitometer의 측정값에 영향을 줄 수 있기 때문에 중요하다.

#### □ 대조물질

모든 시험은 음성대조군 혹은 용매대조군과 양성대조군을 포함하여야 한다.

○ 음성대조군 : 실험물질이 100% 액체 물질의 경우 음성 대조군 (예, 0.9% 염화나트륨 용액 또는 증류수)을 포함시켜야 한다. 이를 통해 시험의 비특이적 변화를 감지할 수 있으며, 결과의 바닥선을 알 수 있다. 또한 이를 통해 시험 결과값이 실험조건 이상에 따라 발생된 것이 아니라는 것을 알 수 있다.

○ 용매대조군 : 실험물질이 희석된 액체, 계면활성제 또는 고체 물질의 경우 용매대조군을 포함하여야 한다. 이를 통해 시험의 비특이적 변화를 감지할 수 있으며, 결과의 바닥선을 알 수 있다. 실험에 영향을 주지 않는 용매만 사용하여야 한다.

○ 양성대조군 : 이미 알려진 자극물질들을 양성대조군으로 사용함으로써 적절한 반응이 유도되었는지를 확인할 수 있다. 양성 대조물질의 자극 정도는 적용 시간에 따라 나타나는 반응의 차이를 가늠할 수 있는 정도가 적절하며 이를 넘어선 지나친 자극을 나타내는 경우 양성대조물질로 사용하기에 적합하지 않다. 액상 실험물질의 양성대조물질로는 1% 수산화나트륨용액 또는 디메틸포름아미드를 사용한다. 고체 실험물질의 양성대조군으로는 이미다졸을 0.9% 염화나트륨용액에 녹여 20 w/v%로 한액을 사용한다.

○ 기준물질 : 잘 알려지지 않은 물질에 대한 눈의 자극성을 평가하거나, 특정 자극 범위에서의 상대적인 눈의 자극성을 평가할 때에는 기준 물질이 유용할 수 있다.

#### □ 측정

○ 혼탁도 : 각막을 통과하는 빛의 투과정도를 opacitometer로 측정한다.

○ 투과도 : 플루오로세이나트륨액이 각막을 통과하는 정도를 측정한다. 실험물질이 액체 또는 계면활성화제인 경우에는 4mg/mL의 플루오로세이나트륨액을, 비계면활성 고체물질인 경우에는 5mg/mL의 플루오로세이나트륨액을 사용한다. 플루오로세이나트륨액 1mL를 상단 챔버에 넣고, 하단 챔버에는 EMEM을 채운다. 홀더를 수평하게 놓고 90±5분 동안 32±1℃에서 배양한다. 배양 후 하단 챔버로 이동한 플루오로세이나

트륨액을 분광광도계로 측정 (측정파장 : 490nm)한다. 투과도는 증장 1cm 값인 OD<sub>490</sub>으로 나타낸다. 대체법으로는 96-well microtiter plate reader를 사용 할 수 있다. 측정의 정확성을 위해 well을 가득 (약 360µL) 채워야 하며, 측정값은 검량선 범위 내에 있어야 한다. 측정값은 증장 1cm 값인 OD<sub>490</sub>으로 환산하여 나타낸다.

#### □ 평가

##### ○ 평가

- 공시험의 혼탁도와 음성대조군 투과도로 교정한 혼탁도와 평균 투과도 (OD<sub>490</sub>)를 다음 식에 대입하여 안점막자극지수를 산출한다.

IVIS(in vitro irritancy score)=평균 혼탁도 (투과도-공시험의 투과도)+(15×평균 투과도 OD<sub>490</sub>)

- 실험물질이 부식 유발여부 또는 심각한 자극여부를 알아보기 위해 혼탁도와 투과도를 개별적으로 평가하여야한다.

##### ○ BCOP 시험 결과의 의의

- IVIS가 55.1 이상인 물질은 부식성이 있거나 고자극성 물질로 분류된다. 실험결과가 음성을 나타내더라도 토끼를 이용한 안점막 자극 시험을 추가로 실시하여 음성여부를 확인하여야 한다.

- BCOP 시험은 EPA, EU, GHS 분류에 따른 토끼 눈을 이용한 안점막자극시험 결과와 비교해보았을 때 79% (113/143) ~ 81% (119/147)의 정확성을 나타내며 위양성 비율은 19% (20/103) ~21% (22/103), 위음성 비율은 16 (7/43) ~ 25% (10/40) 이다. 특정 물질 (알코올, 케톤)이나 상태 (고체)의 결과를 제외시키면 EU (1), EPA (2), GHS (3)의 BCOP의 정확성은 87% (72/83) ~ 92% (78/85)이며, 위양성 비율은 12% (7/58) ~ 16% (9/56), 위음성 비율은 0% (0/27) ~12% (3/26) 이다.

##### ○ 적합여부

- 양성대조군 IVIS값이 최소 3개월마다 새롭게 얻어져 누적된 결과의 평균값± 2× 표준편차 범위 안에 있을 때 시험은 적합하다.

- 또한, 시험을 자주 하지 않는 실험실 (예, 월 1회 이내)의 경우 매회 판정시험을 실시하여야 한다.

- 음성대조군 또는 용제대조군의 반응은 음성대조 물질 또는 용제를 소의 각막에 처리하여 얻은 기존의 혼탁도와 투과도의 상한값을 초과하지 않아야 한다.

#### □ 보고

실험 보고서는 다음을 포함하여야 한다.

○ 실험물질과 대조군 물질

- 일반명 등 명칭, CAS no,
- 순도 또는 조성 (%)
- 이화학적 성질 (물성, 휘발성, pH, 안정성, 화학적 분류, 용해도 등)
- 시험 전 시험/대조 물질 처리방법 (예, 가운, 분쇄)
- 알려져 있는 안정성 정보

○ 시험의뢰자와 실험 시설 정보

- 시험의뢰자의 이름과 주소
- 시험 시설과 시험 책임자
- 소안구 출처 증명 (예, 추출 시설)
- 소안구의 운송 상태 (예, 안구 채집 날짜와 시간, 안구 채집과 실험 시작 전 시간 간격, 수송 배지와 온도, 사용된 항생제)
- 가능한 경우 안구 추출 동물의 특별한 특징 (예, 나이, 성, 체중)

○ 실험 방법 및 계획서의 타당성

○ 신뢰성 확보 방안

실험방법의 신뢰성 (예, 정확성 및 신뢰성)의 확인을 위한 방법 (예, 기지 물질 실험을 통한 숙련, 축적된 양성 음성 대조군 자료 사용)

○ 적합 기준

- 양성과 음성 대조군 시험 결과값이 축적된 기존 자료 결과값 범위 해당여부
- 가능하다면, 기준물질 시험 결과값이 축적된 기존 자료 결과값 범위 해당 여부

○ 실험 조건

- 실험계에 대한 설명
- 각막 홀더의 종류
- 혼탁도와 투과도 측정 장치의 검·교정 정보
- 각막의 상태 정보
- 세부실험방법
- 실험물질 농도
- 실험 과정의 수정 시 이에 대한 기록 및 설명
- 축적된 데이터의 출처 (예, 음성 양성 대조군, 효율성 물질, benchmark 물질)
- 평가 범위에 대한 설명

○ 결과

- 각 군별 도출 결과값을 도표화 (예, 실험물질과 양성 및 음성 대조군, 기준 물질의 혼탁도와 OD<sub>490</sub> 및 계산된 IVIS값, 반복 실험 결과와 각 실험별 평균±표준편차)
- 관찰된 다른 결과에 대한 에 대한 설명

○ 고찰

○ 결론

별첨 1. BCOP 시험법 숙련을 위한 실험물질

BCOP 시험을 시작하기에 앞서 표 1의 물질을 이용하여 숙련도를 입증할 수 있다. 이 물질들은 토끼를 이용한 안점막시험 결과를 기반으로 국소적인 눈의 자극/ 부식에 대한 반응범위를 나타내기 위하여 선정되었다 (TG 405) (i.e., UN GHS에 따른 Categories 1, 2A, 2B, or Not Labeled (3) (7).

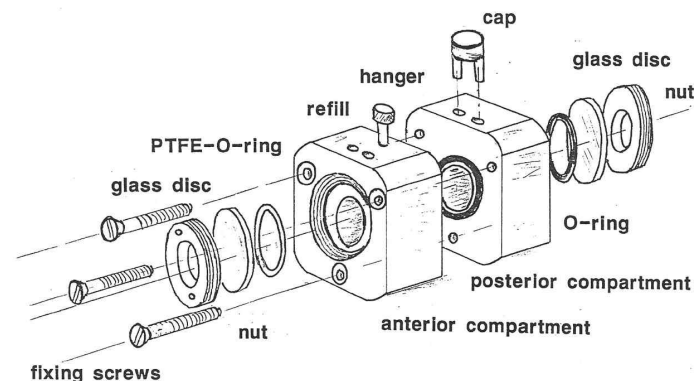
표 1: BCOP 시험법 숙련을 위한 실험물질

Chemical	CASRN	Chemical Class <sup>1</sup>	Physical Form	In Vivo Classification <sup>2</sup>	In Vitro Classification <sup>3</sup>
Benzalkonium chloride (5%)	8001-54-5	Onium compound	Liquid	Category 1	Corrosive/ Severe Irritant
Chlorhexidine	55-56-1	Amine, Amidine	Solid	Category 1	Corrosive/ Severe Irritant
Dibenzoyl-L-tar taric acid	2743-38-6	Carboxylic acid, Ester	Solid	Category 1	Corrosive/ Severe Irritant
Imidazole	288-32-4	Heterocyclic	Solid	Category 1	Corrosive/ Severe Irritant
Trichloroacetic acid (30%)	76-03-9	Carboxylic Acid	Liquid	Category 1	Corrosive/ Severe Irritant
2,6-Dichloroben zoyl chloride	4659-45-4	Acyl halide	Liquid	Category 2A	Non corrosive/ Non severe irritant
Ethyl-2methylac etoacetate	609-14-3	Ketone, Ester	Liquid	Category 2B	Non corrosive/ Non severe irritant
Ammonium nitrate	6484-52-2	Inorganic salt	Solid	Category 2A	Non corrosive/ Non severe irritant
Glycerol	56-81-5	Alcohol	Liquid	Not Labeled	Non corrosive/ Non severe irritant
n-Hexane	110-54-3	Hydrocarbon (acyclic)	Liquid	Not Labeled	Noncorrosive/ Non severe irritant

\* 약어: CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number<sup>1</sup> Chemical classes were assigned to each test substance using a standard classification scheme, based on the National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH) classification system (available at <http://www.nlm.nih.gov/mesh>)<sup>2</sup>Based on results from the in vivo rabbit eye test (OECD TG 405) and using the UN GHS (3)(7).<sup>3</sup>Based on results in BCOP and ICE.

별첨 2. 장치

□ BCOP 각막 홀더 : 재질은 불활성물질이어야 한다. (예, 폴리프로필렌). 홀더는 상, 하단 챔버로 구성된다. 각 챔버는 용량이 5mL이고, 내경 1.7cm와 깊이 2.2cm이다. 각막의 내피가 하단 챔버의 O-링과 맞닿게 두고, 앞부분은 각막 상피 부위에 맞닿게 둔다. 챔버는 바깥 가장자리에 위치한 세 개의 스테인리스 나사에 의해 고정된다. 각 챔버의 끝의 유리창은 각막에 접근이 용이하게 하기 위해 쉽게 제거될 수 있도록 한다. 유리창과 챔버 사이에 누수 방지를 위해 O-링을 사용한다. 각 챔버의 상단에 두개의 구멍을 통하여 배지와 실험물질을 적용하거나 제거할 수 있다. 이 구멍들은 처치 및 배양 기간동안 고무마개로 닫아 놓는다.



□ The OPACITOMETER : 빛의 투과도를 측정하는 장치이다. 빛은 할로젠 램프에서 창 또는 빈 챔버를 통해 포토셀로 전송되며 이는 물질이 들어 있는 챔버를 통과한 빛과 비교된다. 포토셀에서 빛 전송에 차이가 비교되어 불투명도 값이 표시된다. 교정을 위해 교정기 (폴리에스터 불투명 시트)를 교정 챔버 (교정기를 끼울 수 있도록 제작된 각막 챔버)에 장착한 후 측정한다. 교정기가 장착되지 않은 경우 0을 나타내야 하며, 서로 다른 교정기 세 개의 각각의 값은 5% 허용 범위 내에서 각각 75, 150과 225를 나타내야 한다.