등록번호
안내서-1059-01

화장품 안자극 동물대체시험법 (Vitrigel을 이용한 안자극 시험법) 가이드라인

(민원인 안내서)

2020. 9.

식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

독성평가연구부 특수독성과

지침서 · 안내서 제 · 개정 점검표

명칭	화장품 안자극 동물대체시험법(인체각막세포를 이용한 안자극 시험법) 가이드라인(민원인 안내서)

아래에 해당하는 사항에 체크하여 주시기 바랍니다.

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

상기 사항에 대하여 확인하였음.

2020년 9월 30일

담당자 방서영

확 인(부서장) 윤혜성

이 안내서는 화장품 안자극 동물대체시험법(Vitrigel을 이용한 안자극 시험법) 가이드라인에 대하여 알기 쉽게 설명하거나 식품의약품안전처의 입장을 기술한 것입니다.

본 안내서는 대외적으로 법적 효력을 가지는 것이 아니므로 본문의 기술방식('~하여야 한다' 등)에도 불구하고 민원인 여러분께서 반드시 준수하셔야 하는 사항이 아님을 알려드립니다. 또한, 본 안내서는 2020년 9월 현재의 과학적·기술적 사실 및 유효한 법규를 토대로 작성되었으므로 이후 최신 개정 법규 내용 및 구체적인 사실관계 등에 따라 달리 적용될 수 있음을 알려드립니다.

※ "민원인 안내서"란 대내외적으로 법령 또는 고시·훈령·예규 등을 알기 쉽게 풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전처의 입장을 기술하는 것 (식품의약품안전처 지침서등의 관리에 관한 규정 제2조)

※ 본 안내서에 대한 의견이나 문의사항이 있을 경우 식품의약품안전평가원 독성평가연구부 특수독성과에 문의하시기 바랍니다.

전화번호: 043-719-5153, 5155
팩스번호: 043-719-5150

제·개정 이력

연번	제·개정번호	승인일자	주요내용
1			화장품 안자극 동물대체시험법 가이드라인(민원인 안내서) 제정

목 차

화장품 안자극 동물대체시험법
(Vitrigel을 이용한 안자극 시험법) 가이드라인

Ⅰ. 개요

본 시험법은 시험물질에 의한 인체각막상피(Human corneal epithelium, hCE) 모델의 장벽 기능 손상에 근거하여, UN GHS에 따른 안자극 또는 심한 안손상에 대한 분류 및 표시가 필요하지 않은 시험물질(GHS No Category)을 식별하는 생체외(*in vitro*) 시험법(Vitrigel-안자극 시험법, Vitrigel-Eye Irritancy Test Method)이다.

인체각막상피(hCE) 모델에 시험물질 처리 후 3분 동안 상피전기저항(TEER, Trans epithelial electrical resistance) 변화를 측정한다. 시험물질에 의한 hCE 모델의 장벽 기능 손상은 지연 시간(Time lag), 강도(Intensity) 및 plateau 레벨의 세 가지 지표를 사용하여 평가하며, 예측 모델에 따라 No Category로 분류한다.

하지만, 본 가이드라인에 기술된 시험법만으로는 UN GHS에 따른 안자극/가역적 영향(Category 2)과 심한 안손상/비가역적 영향(Category 1)을 구분할 수 없고, 안자극물질(Category 2A)와 약한 안자극물질(Category 2B)을 구별할 수 없다. 따라서 이를 구별하기 위해서는 다른 적합한 생체외(*in vitro*) 시험법이 추가적으로 요구된다.

본 시험법을 일반적으로 사용하는 실험실은 가이드라인에서 제시된 10개의 숙련도 물질을 사용하여 기술적 숙련도를 입증해야 하고, 가이드라인에서 제시하고 있는 인정요건 모두를 만족시키는 결과 값만이 유효한 것으로 인정된다.

Ⅱ. 시험원리

본 시험법은 콜라겐 vitrigel 멤브레인 (CVM, Collagen Vitrigel Membrane) 챔버 안에 설치된 인체각막상피 (hCE) 모델을 이용하여 각막 상피의 장벽 기능 손상을 평가하고, 이를 바탕으로 안 자극 또는 안 손상에 대한 분류 및 표시가 필요 없는 화학물질 (No Category)을 확인하는 생체 외 시험법이다. 시험물질의 안 자극성은 시험물질에 3분 동안 노출시킨 후의 hCE 모델의 장벽 손상 정도를 종말점으로 하여 상피전기저항 (TEER) 값의 변화를 분석함으로써 예측한다.

Ⅲ. 제한점 및 고려사항

Vitrigel 안 자극 시험법은 강한 휘발성의 시험물질, formazan dye와 동일한 파장 범위의 빛을 흡수하는 시험물질, tetrazolium dye를 직접적으로 환원시키는 시험물질에 모두 적용할 수 있으나, 고체 시험물질이나 산성 시험물질 (2.5% (w/v)에서 pH≦5인 경우)에는 적용할 수 없다. 또한, 본 시험법에 의해서는 UN GHS 카테고리 2 (안자극/다시 회복 가능함)와 카테고리 1 (심한 안손상/회복되지 않음) 사이의 구별 및 카테고리 2A (눈에 자극성임)와 카테고리 2B (눈에 약한 자극성임) 사이의 구별이 불가하므로, 이러한 경우 다른 생체 외 시험법을 사용한 추가 시험이 필요하다.

IV. 시험방법

4.1. 인체각막상피 (hCE) 세포주 배양

불멸화된 인체각막상피 세포는 5% 불활성화된 태아 소 혈청, 5 μg/mL 재조합 인간 인슐린, 10 ng/mL 재조합 인간 표피 성장 인자, 0.5% DMSO (Dimethyl sulfoxide), 100 units/mL 페니실린 및 100 μg/mL 스트렙토마이신을 포함하는 DMEM 배지와 영양 혼합물 F-12의 1:1 혼합 배양배지를 사용하여 5% CO_2 및 37 °C 조건에서 배양한다. 박테리아, 바이러스, 마이코플라스마 및 곰팡이에 의한 오염이 없어야 한다.

4.2 콜라겐 vitrigel 막 (CVM) 챔버의 설치

콜라겐 제로겔 (xerogel) 막 챔버를 12-웰 플레이트의 웰 안쪽에 설치하고, 사용 직전에 챔버 바깥쪽과 안쪽에 각각 1.5 mL, 0.5 mL의 배양배지를 첨가한 후 xerogel이 vitrigel로 전환되도록 10분간 기다린다. 만약 다른 챔버를 사용할 경우에는 챔버 안에 들어가는 hCE가 적절한 TEER 값을 보여야 한다.

4.3 인체각막상피 (hCE) 모델 제작

4.3.1 CVM 내 hCE 세포 배양

챔버 바깥쪽 배지를 신선한 1.5 mL 배지로 교체하고 챔버 안쪽 배지를 조심스럽게 제거한 후 1.2×10^5 개/mL의 밀도를 갖는 세포 현탁액 0.5 mL를 챔버의 CVM 위에 부어준다. 2 일간 배양 후 챔버 안쪽 배지를 조심스럽게 제거하고 챔버 바깥쪽 배지는 신선한 배지로 교체한다. 이 상태로 세포를 공기와 액체의 경계면에서 4 일간 더 배양한다.

4.3.2 인체각막상피 (hCE) 품질 확인

TEER 값을 측정하여 hCE 모델의 장벽 기능을 확인한다. TEER 측정시스템의 긴 전극과 짧은 전극을 각각 챔버 바깥쪽과 안쪽 배지에 넣고 TEER 값을 측정하여 그 값이 140 $\Omega \cdot cm^2$ ~ 220 $\Omega \cdot cm^2$ 범위에 해당하면 해당 모델은 이 시험에 적합한 것으로 본다.

4.4 hCE 모델의 TEER 값 측정

TEER 값은 CVM 챔버안에 hCE가 들어있을 때와 들어있지 않을 때의 전기저항값들(각각 Rmodel, Rblank)을 고려하여 아래의 식에 따라 계산한다.

hCE 모델 TEER 값 ($\Omega \cdot cm^2$) = {Rmodel(Ω)-Rblank(Ω)} × 유효 표면 면적(cm^2)

또한, 시험 측정 전에 TEER 측정 시스템의 감도를 확인하여야 하며 이를 위해 0.45%, 0.9% 두 가지 농도의 염화나트륨 수용액의 TEER 값을 측정하고 그 차이가 60 $\Omega \cdot cm^2$ 이상이 되면 TEER 측정 시스템이 정상 작동하는 것으로 본다.

4.5 대조 물질 준비

음성대조물질로는 생리식염수, 양성대조물질로는 benzalkonium chloride, hCE의 품질 확인을 위한 기준 대조물질로는 에탄올을 사용한다. 대조 물질의 최종농도는 2.5% (w/v)이다.

4.6 시험 물질 조제

시험 물질의 최종 농도는 2.5%(w/v)가 되도록 조제한다. 만약 잘 녹지 않을 경우, 아래의 방법 중 하나를 선택하여 수행한다.

1) 최대 1분간 볼텍스 믹서(vortex mixer)를 이용하여 혼합한다.

2) 최대 20분간 초음파를 이용하여 분산한다.
3) 최고 70℃ 까지 가열한다.
4) pH 시험지 또는 pH 측정기를 이용하여 배지중의 pH를 측정한 후 pH 값이 5 이하일 경우 그 시험 물질에 대해서는 시험하지 않는다.

4.7 숙련도 시험

이 시험을 일상적으로 수행하여 시험결과를 생산하기 위해서는 우선 이 시험에 대한 실험실의 숙련도가 입증되어야 한다. 이를 위해서는 표 1에 열거된 10 종의 숙련도 물질에 대해 시험하고 그 결과 값이 표 1에 제시된 분류 내용과 일치하는 지를 확인한다. 숙련도 시험에 아래 물질을 사용할 수 없는 경우에는 적절한 생체 내 및 생체 외 시험결과가 존재하는 다른 물질로 대체할 수 있다.

[표1] Vitrigel을 이용한 안 자극성 시험에 대한 숙련도 시험의 물질 및 결과 분류

번호	UN GHS 카테고리 숙련도 물질	분류내용
생체 내 UN GHS 카테고리 1		
1	3-(2-Aminoethylamino)propyltrimethoxysilane (CASRN. 1760-24-3)	판정 보류[1)] (본 시험만으로는 안자극성을 분류할 수 없어 추가적인 시험이 필요한 물질) (No prediction can be made)
2	Tetraethylene glycol (CASRN. 17831-71-9)	판정 보류[1)] (본 시험만으로는 안자극성을 분류할 수 없어 추가적인 시험이 필요한 물질) (No prediction can be made)
3	Butanol (CASRN. 71-36-3)	판정 보류[1)] (본 시험만으로는 안자극성을 분류할 수 없어 추가적인 시험이 필요한 물질) (No prediction can be made)
생체 내 UN GHS 카테고리 2A		
4	gamma-Butyrolactone (CASRN. 96-48-0)	판정 보류[1)] (본 시험만으로는 안자극성을 분류할 수 없어 추가적인 시험이 필요한 물질) (No prediction can be made)
5	Cyclopentanol (CASRN. 96-41-3)	판정 보류[1)] (본 시험만으로는 안자극성을 분류할 수 없어 추가적인 시험이 필요한 물질) (No prediction can be made)

생체 내 UN GHS 카테고리 2B		
6	2-Methyl-1-pentanol (CASRN. 105-30-6)	판정 보류[1)] (본 시험만으로는 안자극성을 분류할 수 없어 추가적인 시험이 필요한 물질) (No prediction can be made)
7	Ethyl-2-methylacetoacetate (CASRN. 609-14-3)	판정 보류[1)] (본 시험만으로는 안자극성을 분류할 수 없어 추가적인 시험이 필요한 물질) (No prediction can be made)
생체 내 UN GHS 카테고리 없음		
8	iso-Octyl acrylate (CASRN. 29590-42-9)	비자극성 물질[2)] (안 자극성 분류가 필요하지 않은 물질) (No category)
9	2-(n-Dodecylthio) ethanol (CASRN. 1462-55-1)	비자극성 물질[2)] (안 자극성 분류가 필요하지 않은 물질) (No category)
10	iso-Octylthioglycolate (CASRN. 25103-09-7)	비자극성 물질[2)] (안 자극성 분류가 필요하지 않은 물질) (No category)

[1)]판정 보류: 분류를 위해서는 IATA 지침서에 따라 추가적인 정보를 확보하여야 하며 이러한 물질은 UN GHS 분류상으로는 카테고리1, 카테고리 2A또는 2B에 속하는 물질임
[2)]비자극성물질: GHS분류상으로 심각한 안손상이나 안자극성에 대한 분류가 필요하지 않은 물질임

4.8 대조 물질 및 시험 물질의 적용

사전에 품질을 확인한 후 적합한 것으로 확인된 hCE 모델을 시험에 사용한다. 챔버 안쪽 배지를 조제된 0.5 mL 시험 물질로 교체한 후부터 3분 동안 10초 간격으로 Rmodel 값을 측정한다. 대조 물질 및 시험 물질 각각에 대해 최소 3개 이상의 hCE 모델이 사용되어야 한다. 재현성을 확보하기 위해서 대조물질 또는 시험 물질 노출 직후 2초 ~ 5초 사이에 TEER 값을 측정하여야 하며 측정시간 동안 시험물질 및 hCE 모델은 28±2℃를 유지하여야 한다.

4.9 예측모델

3회 시험의 평균 TEER 값을 다음의 3가지 지표를 이용하여 분석한다.

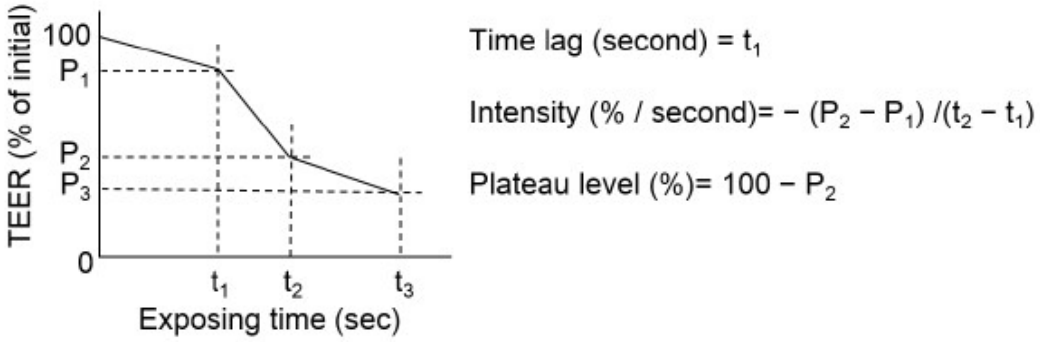
1) 지연 시간(초) (Time lag) : (t1)

2) 강도(%/초) (Intensity) : (-[P2-P1] / [t2-t1])
3) 안정기 수준(%) (Plateau level) : (100 - P2)

측정된 TEER 값의 지표 중 지연시간 (Plateau time, t1)이 180 초를 초과하고, 강도 (-[P2-P1] / [t2-t1])가 0.05%/초 미만이며 안정기 수준 (100 - P2)이 5% 이하인 조건을 모두 만족할 때 '비자극성 물질'로 판단하며, 그 외의 모든 경우는 '판정 보류'로 분류한다. (표2, 그림1 참조)

[표2] UN GHS분류기준에 따른 실험결과 값의 기준 및 분류 내용

기준	분류 내용
지연 시간 ≤ 180 초 또는 강도 ≥ 0.05%/초 또는 안정기 수준 > 5.0%	판정 보류 (본 시험만으로는 안자극성을 분류할 수 없어 추가적인 시험이 필요한 물질) (No prediction can be made)
지연 시간 > 180 초 그리고 강도 <0.05%/초 그리고 안정기 수준 ≤ 5.0%	비자극성 물질 (안자극성 분류가 필요하지 않은 물질) (No category)



t1 (초); 프로파일이 0 ≥ dP/dT > −0.03%/초로 유지되는 최대 시간
t2 (초); 프로파일이 dP/dT ≤ −0.03%/초로 유지된 후 0 ≥ dP (P3−P2)/dT (t3−t2) > −0.03%/초로 유지되는 초기 시간
t3 (초); 안정기 수준은 30 초 동안 프로파일에 의해 평가되므로 t2+30 초
P1 (%); 0 초의 TEER 값에 대한 t1의 TEER 값의 백분율
P2 (%); 0 초의 TEER 값에 대한 t2의 TEER 값의 백분율
P3 (%); 0 초의 TEER 값에 대한 t3의 TEER 값의 백분율
dP/dT; P를 T로 미분한 값

[그림1] hCE 모델에 시험물질을 처리한 후의 TEER 프로파일 분석 그래프

V. 인정요건

Vitrigel 안자극 시험법은 다음의 인정요건을 충족해야 한다.

1) 음성대조군의 안정기(Plateau) 수준 5% 이하
2) 양성대조군의 안정기(Plateau) 수준 40% 이상
3) 기준대조군의 안정기(Plateau) 수준 10% 이상
4) 각 시험 물질의 TEER 프로파일 평균 표준 편차 15% 이하
5) 검증 연구에서 양성 대조군에 의한 과거의 결과 범위는 65%에서 90% 이다.

VI. 시험결과 및 보고

시험보고서는 다음의 사항을 포함한다.

시험물질과 대조군 물질

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

시험법 조건과 방법

- 시험의뢰기관, 시험기관, 및 연구책임자의 이름과 주소 등
- 사용된 시험 방법에 대한 설명
- 사용된 시험 방법의 세부사항
- 사용된 세포주, 그 출처, 계대수 및 시험에 사용된 세포의 융합
- 시약 공급업체, 카탈로그 번호 및 로트번호

- hCE 세포를 계대배양한 시간 및 날짜, 트립신 처리 기간, 세포의 희석 비율
- hCE 모델 준비를 위해 진행한 각 단계의 기간
- TEER 측정 시스템에 대한 QC 점검 자료
- 제조된 시험물질에 대한 기록(예, 시험물질 무게, 배지 부피, 혼합 방법 및 시험물질의 용해도, 시험물질의 pH)
- 노출시험 시작 시 hCE 모델과 제조된 시험물질의 온도
- hCE 모델의 로트 번호
- CO_2 배양기에서 hCE 모델을 꺼내 시험물질을 처리한 시간
- TEER 측정 시스템으로 TEER 측정을 시작한 시간
- 시험물질의 농도(권장되는 농도와 다른 경우)
- 시험물질을 노출한 시간(권장되는 노출시간 or 조건과 다른 경우)
- 각 시험에 사용된 hCE 모델 수 및 시험 횟수(권장되는 것과 다른 경우)
- 시험방법의 수정사항에 대한 설명
- 시험법 사용 전 숙련도 확인용 물질에 대한 평가로 시험법 수행의 숙련도 입증

결과

- 각 시험물질 및 대조군 물질에 대한 각 hCE 모델의 물질 처리 전 TEER 값 및 3분 동안 시험물질에 노출시킨 후의 시간 의존적 TEER 값, 3개 지표의 점수, 시험물질의 생체 외(*in vitro*) 예측값에 대해 표 형식으로 보고해야 한다.
- 관찰된 다른 영향에 대한 설명

시험결과의 토의

결론

별첨 1. 번역본(OECD TG 494)

안자극 또는 심한 안 손상에 대한 분류 및 표지가 필요하지 않는 시험물질의 식별을 위한 Vitrigel-안자극 시험법

Vitrigel-Eye Irritancy Test Method for Identifying Chemicals Not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage

개요

1. "심한 안 손상(Serious eye damage)"은 눈이 화학물질이나 혼합물에 노출된 후 나타나는, 완전히 회복되지 않는 안조직 손상 또는 심각한 물리적 시력 감퇴를 의미한다 [UN의 화학물질의 분류 및 표시에 관한 국제조화시스템(UN GHS)에 의한 정의](1). 또한 UN GHS에 따르면, "안자극(eye irritation)"은 눈이 화학물질이나 혼합물에 노출된 후 나타나는 완전히 회복 가능한 눈의 변화를 말한다. 심한 안 손상을 일으키는 시험물질은 UN GHS Category 1로 분류하고 안자극을 일으키는 시험물질은 UN GHS Category 2로 분류하며 이는 하위분류인 2A와 2B를 포함하고 있다. Category1 이나 category2에도 해당되지 않는 시험물질은 안자극이나 심한 안 손상의 분류를 요구하지 않으며 이는 'UN GHS No Category'로 지칭한다.

2. 심한 안 손상/안자극의 평가는 오래전부터 OECD TG 405에 기술된 바와 같이 실험동물이 이용되어져 왔으며, 이 가이드라인은 1981년에 채택되어 1987년, 2002년, 2012년과 2017년에 개정되었다(2). 가장 적절한 시험 방법의 선정과 본 시험 가이드라인의 활용은 심한 안 손상/안자극에 대한 통합독성평가(IATA) OECD 지침 문서의 맥락에서 볼 수 있다(3). 그러나 본 시험법은 안독성 회복 가능성측면에서 다루고 있지않다. 따라서, 분류 목적으로 사용할 시험법들의 조합을 선택할 때 GD263(2)에 설명되었듯이 기존 데이터와 정보를 바탕으로 시험물질과 관련된 모든 안구 독성 메커니즘을 고려해야 한다.

3. Vitrigel-안자극 시험법(Vitrigel-Eye Irritancy Test, EIT)은 UN GHS(1)에 따른 안자극 또는 심한 안 손상에 대한 분류 및 표시가 필요하지 않은 시험물질(GHS No

Category)을 추가시험 없이도(9,10, 11) 식별할 수 있는 생체 외(*in vitro*) 시험법이다. Vitrigel-안자극 시험법은 Scott et al(2010)이 제안한 바와 같이 상향식 접근방식(bottom-up approach)에서 수행되어 심한 안 손상 또는 안자극에 대한 분류가 필요하지 않은 시험물질, 즉 UN GHS No Category를 식별한다. 그러나 Vitrigel-안자극 시험법은 UN GHS Category 1과 UN GHS Category 2를 구분하는 목적으로 개발되지 않았다. 카테고리를 구별 하기 위해서는 추가적인 시험 전략이 필요할 것이다(3).

4. 본 시험 가이드라인은 Yamaguchi와 Takezawa (17)가 개발한 프로토콜을 기반으로 하며, 일본 대체법검증센터(JaCVAM)에서 동물대체시험법 국제협력(International Collaboration on Alternative Test Methods, ICATM)과 협력하여 조직한 검증위원회(Validation Management Team, VMT)의 검증연구를 거쳤다(18). 검증연구는 일본의 3개 참여 실험실에서 수행되었고, 검증 보고서는 국제 전문가들로 구성된 독립적인 전문 평가단의 평가를 거쳤다(19). 또한 OECD 전문가 그룹은 Vitrigel-안자극 방법이 고체형태 물질을 제외한 pH 5.0(2.5% 무게/부피 (w/v) 제조 기준에 따라)을 초과하는 시험물질에 제한적으로 적용할 경우, UN GHS No Cat.(안자극이나 심각한 안 손상에 대한 분류 및 표시가 필요하지 않은 시험물질)의 식별을 위한 상향식 접근방식의 첫 단계로 사용하기에 적합하다는 결론을 내렸다.

5. 본 가이드라인은 시험물질이 Vitrigel-안자극 시험법에서 사용된 인체 각막 상피(hCE) 모델 장벽 기능의 손상을 일으키는 것에 근거하여, 시험물질의 안자극성을 평가하는 방법을 설명한다. 기존의 생체 외(*in vitro*) 시험법에서는 생체 외(*in vitro*) 세포 배양에서의 세포 생존율 또는 ex vivo로 분리된 안구의 각막 혼탁도를 평가항목으로 사용해 왔다. 눈에 자극을 일으키는 화학물질은 먼저 눈물 막과 눈의 상피 장벽 기능을 파괴하고, 이어 상피 세포 사멸을 유도하며, 최종적으로 간질 퇴행 및 내피 세포 사멸을 일으켜 각막 혼탁을 초래하는 것으로 알려져 있다(12, 13). 따라서, 상피 장벽 기능의 변화는 안자극을 확인하기 위한 적절한 평가항목이다.(14, 15). Vitrigel-안자극 시험법에서, 시간에 따른 상피간 전기적 저항(Transepithelial Electrical Resistance,TEER) 값의 변화는 시험물질에 노출된 후의 각막 상피의 장벽 기능에 대한 손상을 나타낸다. 이는 시험물질에 노출된 후 토끼 각막에서 관찰되는 손상과 유사하며, 각막 상피 손상 및 안자극을 유발하는 중요한 작용 기전이다(9, 14).

6. 본 시험법 가이드라인에서의 "시험물질(test chemical)"은 시험되는 물질을 의미하며, 그 물질이 Vitrigel 안자극 시험법에 적용 가능한지의 여부를 나타내지는 않는다.

7. 용어정의는 부록 1에 서술되어 있다.

시험 원리

8. Vitrigel-안자극 시험법은 콜라겐 vitrigel 막(CVM) 챔버(10)에서 제조된 hCE 모델을 사용한 생체 외 분석 방법이다. 시험물질의 안자극여부는 3가지 지표의 점수를 사용하여 TEER 값의 시간에 따른 변화를 분석하여 예측한다 (표 1의 예측 모델 참조).

9. 토끼의 눈에 적용된 용액의 80%가 3분에서 4분 내에 결막 낭을 통해 배출되며, 인체의 눈에 적용된 용액의 80% 이상이 1분에서 2분 내에 배출되는 것으로 보고되었다(16). Vitrigel-안자극 시험법은 이러한 노출 시간을 대략적으로 반영하고, hCE 모델에 시험물질을 3분 동안 노출시킨 후 장벽 손상 정도를 평가하기 위해, 시험물질의 hCE 모델 장벽 손상 기능을 평가항목으로 사용한다.

초기 고려사항과 제한점

10. Vitrigel-안자극 시험법은 고 휘발성 시험물질, 포르마잔 염료와 동일한 범위의 파장에서 빛을 흡수하는 시험물질, 테트라졸리움 염료를 직접 환원시킬 수 있는 시험물질들에 적용 가능하다(15 문단 참조). 그러나 고체형태 물질이나 산성 물질은 아래에 설명된 바와 같이 시험법을 적용 할 수 없다.

11. 검증연구의 결과는 3개 실험실 모두에서 실험실 내 재현성 80 - 100%, 실험실 간 재현성 92%로 나타났다. 예측력은 검증연구와 93개 시험물질(in-house data)에 대한 개발자의 기관내 데이터를 가지고 평가되었다. 시험물질은 UN GHS 카테고리, 물리적 상태 및 화학 물질 등급에 따라, 안자극성의 측면에서 다양한 범위의 물질을 선택하였다. 이러한 시험물질은 대부분 단일 성분으로 이루어져 있었지만, 8개의 다성분물질(모두 중합체)과 1개의 UVCB (sucrose ester)도 포함되었다(20, 21, 22). 예측력 평가에 사용된 93개의 시험물질은 56개의 액체와 37개의 고체로 구성되었다. Vitrigel-안자극 시험법은 83%(50/60)의 민감도, 70%(23/33)의 특이도 및 78%(73/93)의 정확도를 달성했다.

12. 위음성 결과의 분석에서 10개 위음성 시험물질 중 5개가 산성이었으며 노출에

사용된 2.5% 시험물질용액은 5 미만의 pH 값을 나타내었다. 일반적으로 UN GHS No Category 화학물질에 노출된 후 hCE 모델의 TEER 값은 초기 TEER 값에서 거의 변하지 않았다. 또한, UN GHS Category 1 / 2A / 2B 화학물질에 노출된 후 hCE 모델의 TEER 값은 감소하였다. hCE 모델의 TEER 값은 5개의 산성 시험물질에 노출된 후에는 증가하여 위음성을 나타냈다. 산성 시험물질에 따른 TEER 값 증가는 이전에 보고된 바 있다 (23, 24). 위 사실을 근거로, 2.5% 무게/부피 (w/v) 시험물질용액에서 pH값이 5이하를 갖는 모든 시험물질은 본 시험 방법의 적용 가능 영역에서 제외된다. 또한, 배양배지에서 쉽게 분리되는 불수용성 고체는 위음성 결과를 나타내는 경향이 있다. 고체형태 물질은 생체 내 Draize 안자극 시험에서 가변적이고 지나친 노출 환경을 유발하여 실제 자극와 다른 예측 결과를 초래할 수 있다(2). 따라서, 고체형태 물질은 시험법의 적용 가능 영역에서 제외된다. 위 고려 사항에 따라, 최초 93개의 시험물질 중 42개가 시험법의 적용 가능 영역에서 제외되었다. 나머지 51개 시험물질에는 7개 다성분 물질이 포함된다. 결과적으로 민감도는 83%에서 96%(23/24), 특이도는 70%에서 74%(20/27) 정확도는 78%에서 84%(43/51)로 향상되었다.

13. 시험법은 높은 비율의 위양성 결과를 나타낸다. 그러나 Vitrigel-안자극 시험법의 위양성율은 본 시험 가이드라인의 맥락에서 중요하지 않다. 왜냐하면, "판정 보류"로 판정된 모든 시험물질은 심각한 안 손상/안자극에 대한 통합독성평가에 수록된 OECD 지침 문서에 따라 규제 요건에 맞게 추가적인 정보를 얻거나 추가적으로 시험법을 수행해야 하기 때문이다(3). 본 시험법을 UN GHS 이외에 다른 분류 체계에 적용하기 위해서는 사전에 해당 규제당국과 협의해야 한다.

14. 본 시험 가이드라인의 제한점은 UN GHS에 분류된 안자극/ 가역적 영향(Category 2)과 심한 안 손상/ 비가역적 영향(Category 1)을 구분하지 못하고, 안자극물질(Category 2A)와 약한 안자극물질(Category 2B)도 구분하지 못한다는 것이다(1). 이러한 제한점을 극복하기 위해서는, 다른 적합한 생체외(*in vitro*) 시험방법이 추가적으로 요구된다(3).

15. 본 시험 가이드라인은 단일 액체 성분 물질, 다성분 물질, 조성이 알려져 있지 않거나 가변적인 성분의 물질, 복잡한 반응산물 및 생물학적 물질(UVBC 물질들)에 기술적으로 적용 가능하다. 그러나 혼합물과 가스 및 에어로졸은 검증연구에서 평가되지 않았다. 혼합물, 시험하기 어려운 화학 물질(예: 불안정한 물질) 또는 본 가이드라인에 서술된 적용 가능 영역에 명확하게 포함되지 않은 시험물질을 적용할 때에는, 시험 결과가 과학적으로 의미 있는 결과를 산출할 수 있는지 여부를 사전에 고려해야 한다.

혼합물의 시험에 대한 규제 요구조건이 있는 경우에는 이러한 사전 고려가 필요하지 않다. 포르마잔 염료와 같은 파장대의 빛을 흡수하는 시험물질이나 MTT 테트라졸리움 염료를 직접적으로 환원시킬 수 있는 시험물질 또한 Vitrigel-안자극 시험법으로 시험 가능하다.

16. 위에서 언급된 적용 가능 영역 내에 속하는 시험물질(즉, 2.5% 무게/부피(w/v)에서 pH값이 5를 초과하는 시험물질, 단, 고체형태 물질은 제외)은 배양액에 2.5% w/v의 농도로 용해시킨 다음 Vitrigel-안자극 시험법에 적용시킬 수 있다. 쉽게 용해되지 않는 시험물질은 다음 중 하나를 시행한 후에 시험법에 적용할 수 있다. a) 볼텍스(Vortex) 믹서를 사용하여 기계적으로 혼합, b) 초음파 처리 및/또는 c) 최고 온도 70°C로 가열(시험방법 참조).

숙련도 확인

17. 본 시험 가이드라인에 Vitrigel-안자극 시험법을 일반적으로 사용하기 전에 부록 2의 표 2에 제시된 10가지 숙련도 물질을 정확하게 분류하여 기술적 숙련도를 증명하여야 한다. 숙련도 물질은 토끼 안자극시험(OECD TG 405)에서 얻은 결과와 UN GHS 분류 체계를 근거로 하여 생체 내 안 손상/안자극 반응의 전 영역을 포함하도록 선별되었다(1). 숙련도 시험물질의 또 다른 선정 기준으로는 상업적으로 구입 가능해야 하며, 고품질의 생채 내(in vivo) 참고 데이터와 Vitrigel-EIT 시험법으로 얻은 고품질의 생체 내(*in vitro*) 참고 데이터가 있는 것이어야 한다고 규정한다(18). 제시된 시험물질을 구할 수 없거나 다른 정당한 이유로 사용할 수 없는 경우, 적절한 생체 내 및 생체 외 참고 데이터가 있는 다른 숙련도 시험물질로 대체해야 한다.

시험방법

18. 다음 단락들은 VRM (Validated Reference Method)이라고 일컫는 Vitrigel-안자극 시험법에서 필요한 구성 요소와 시험방법을 설명한다(17). 시험은, “우수 생체외 방법 기준”(Good *In Vitro* Method Practices)(25)에 따라 수행해야 한다. 이 프로토콜에서 정수로 지정된 값은 추가 유효숫자 한자릿수까지 정확한 값으로 간주한다. 따라서, "37℃"는 36.5℃에서 37.4℃ 사이의 범위를 나타낸다.

hCE 세포의 배양

19. 불멸화된 hCE 세포[1]는 Dulbecco's modified Eagle 배지와 혼합 영양액 F-12의 1:1 혼합물에 5%의 불활성화된 FBS, 5 μg/mL의 인슐린, 10 ng/mL의 EGF, 0.5% DMSO, 100 units/mL 페니실린 및 100 μg/mL 스트렙토마이신을 추가한 배양액에서 배양한다. 세포는 37℃, 5% 이산화탄소를 포함한 습윤한 조건에서 배양한다. 또한 시험물질을 모델에 적용할 때를 제외하고, 세포는 박테리아, 바이러스, 마이코플라스마 및 곰팡이에 의한 오염이 없어야 한다.

CVM 챔버 준비

20. 콜라겐 제로겔(xerogel) 막 챔버(즉, VRM에서 사용되었던 ad-MED Vitrigel)를 12-웰 플레이트에 장착하고, 사용하기 직전에 챔버 외부에는 1.5 mL, 챔버 내부에는 0.5 mL의 배양액을 넣어 잠기게 한 후 10분 동안 기다려서 xerogel이 vitrigel로 전환되도록 한다. 대체 챔버를 사용하는 경우 그 챔버에서 준비된 hCE 모델은 적절한 TEER 값을 나타내야 한다.

hCE 모델의 제작

세포 배양 방법

21. 12-웰 플레이트의 각 웰에 들어있는 챔버 외부의 배양액을 1.5 mL의 새 배양액로 교체한다. 챔버 내부의 배양액은 마이크로 피펫을 사용하여 조심스럽게 제거하고 1.2 x 10^5 세포/mL 밀도의 세포 현탁액 0.5 mL를 챔버의 CVM에 붓고 37 °C에서 2일 동안 배양한다. 마이크로 피펫을 사용하여 내부 배양액을 조심스럽게 제거하고 외부 배양액을 새로운 배양액으로 교체한 후, 세포를 공기-액체 계면에서 추가로 4일 이상 배양하여 hCE 모델을 얻는다. 공기-액체 계면 배양 3일 째에 챔버 외부의 배양액을 교체한다.

품질 점검

22. hCE 모델은 화학 물질 노출 후 급격히 파괴되는 것을 막기 위해 실제 hCE와 동등한 정도로 충분히 견고해야 한다. 각 hCE 모델의 장벽 기능은 TEER 값을 측정하여 확인한다. 먼저, 500 μL의 새로운 배양액을 hCE 모델의 챔버에 넣고 배양액 온도를 28±2℃로 조정한다. 다음으로, TEER 측정 시스템의 긴 전극("hCE 모델에서 TEER 값 측정"섹션 참조)은 챔버 외부의 배양액에 장착하고 짧은 전극은 챔버 내부의 배양액에 장착한 다음 각 hCE 모델의 TEER 값(노출 전 TEER 값)을 측정한다. TEER 값이 적절한 범위 내에 있는 hCE 모델만 당일 시험하는 데에 적합하다. VRM의 경우 140 Ω·cm^2 ~

1) HCE-T cells, RCB no. 2280 (RIKEN BioResource Center, Tsukuba, Japan). 본 시험가이드라인을 수행하기 위해서는 사전에 RIKEN BRC와 MTA (물질이전계약)이 필요하다.

220 Ω·cm^{2}의 TEER 값을 가진 hCE 모델이 시험에 적합하다.

hCE 모델에서의 TEER 값 측정

23. hCE 모델의 TEER 값은 저전압 및 교류의 전기 저항 측정기를 사용하여 측정해야 한다. 계측기의 일반적인 사양은 50 - 1,000 Hz의 교류 전류와 최소 0.1 - 3 kΩ의 측정 범위를 갖는다. VRM에 대한 TEER 측정 시스템의 이미지는 부록 3에 나와 있다. 대체 장치를 사용할 경우, 동일한 결과를 생성한다는 것을 입증해야 한다. 전극 유닛은 직경 23 mm, 높이 35 mm이다. 내부 전극은 챔버 내부에 위치하고 외부 전극은 챔버 외부에 위치한다. 내부 및 외부 전극 사이의 거리는 고정시켜, 전기 저항 값에 영향을 주지 않도록 한다. 또한, 저항 값을 측정하는 동안 챔버의 내부 및 외부의 배양액 또는 완충 용액에 전극을 담그는 깊이도 고정시킨다. CVM 챔버에서 배양된 hCE 모델(R model) 및 비어있는 blank CVM 챔버(R blank)의 전기 저항 값을 측정한다. hCE 모델의 TEER 값은 다음과 같이 계산한다:

$$\text{hCE 모델의 TEER 값 } (\Omega\cdot cm^2) = \{R\ model\ (\Omega)\ -\ R\ blank\ (\Omega)\} \times \text{유효 표면적 } (cm^2)$$

24. TEER 측정 시스템의 감도는 테스트 전에 확인해야 하며 적절한 범위가 제공되어야 한다. 이는 다른 전도도를 갖는 둘 이상의 용액의 전기 저항을 측정함으로써 얻을 수 있으며, 이들 전도도의 차이가 정해진 값 내에 있음을 확인하면 된다. VRM의 경우 TEER 측정 시스템의 사전 작동 점검은 다음과 같이 수행된다. CVM이 없는 각각의 챔버(CVM이 없는 ad-MED Vitrigel)를 12-웰 플레이트 중 2개의 웰에 장착한 뒤 25±5℃에서 한 웰은 3.0 mL의 0.90% NaCl 수용액으로 채우고, 다른 한 웰은 0.45% NaCl 수용액으로 채운다. 그런 다음 TEER 측정 시스템을 사용하여 두 웰의 TEER 값을 측정한다. 측정된 TEER 값이 다음 조건을 충족하면 TEER 측정이 정상적인 것으로 간주한다.

$$(0.45\%\ NaCl\ \text{수용액의 TEER 값}) - (0.90\%\ NaCl\ \text{수용액의 TEER 값}) \geq 60\ \Omega\cdot cm^2$$

대조 물질의 준비

25. Vitrigel-안자극 시험법은 식염수를 음성 대조물질, 벤잘코늄 클로라이드를 양성 대조물질, 중간 범위에서 반응을 일으키는 에탄올을 표준참조물질로 설정한다. 표준참조물질은 hCE 모델의 품질을 확인하는 데 이용된다. 대조물질 용액의 조제는 15ml 튜브에 식염수, 벤잘코늄 클로라이드 또는 에탄올 0.1~0.2 g을 첨가하고 적절한 양의 배양액을 튜브에 넣어 2.5% w/v의 농도로 한 후 균일하게 섞일 때까지 혼합한다. 그

외에, 기준 물질은 알려지지 않은 화학물질의 안자극성 평가 또는 특정 범위의 자극 반응을 일으키는 화학 물질의 상대적 안자극 평가에 유용하다.

시험물질의 조제

26. 2.5% w/v 시험물질용액의 전기저항값은 시험물질의 전도도와 상관없이 배양액의 전기 저항에 거의 영향을 주지 않기 때문에, 보통 시험물질 용액이나 현탁액은 배양액에서 2.5% w/v의 농도로 조제한다. 시험물질은 배양액에서 용해될 때까지 또는 최대 1분동안 수동으로 혼합한다. 시험물질이 쉽게 용해되지 않을 경우 추천 순서대로 나열된 다음 방법 중 하나를 사용한다.

a) 볼텍스를 사용하여 최대 1분 동안 기계적으로 혼합
b) 최대 20분 동안 초음파 처리 또는
c) 최대 온도인 70℃로 가열

혼합 후, 핫플레이트(hot plate)나 항온수조(water bath) 또는 에어컨을 사용하여 조제된 시험물질의 온도를 28±2℃로 맞추고, 시험물질의 용해 정도를 육안으로 확인한다. 다음 단계는 시험물질 용액이 잘 용해되거나 균질하게 분산 된 후에만 수행할 수 있다. 상기 방법을 사용했지만 불용성 또는 비혼합성인 시험물질의 경우, 시험물질을 배양액에 넣어 사용 직전에 최대 1분 동안 볼텍싱하여 균질한 현탁액으로 시험물질을 조제한다. 2.5% 조제된 각 시험물질의 pH는 pH 1에서 11의 범위를 나타낼 수 있는 보편적인 pH 시험지 또는 pH 측정기를 사용하여 측정된다. 2.5% 제조물질의 pH가 ≤ 5 인 경우, 그 물질은 시험할 수 없다.

시험물질 및 대조물질의 적용

27. 품질 검사를 통과한 hCE 모델은 시험물질 처리가 가능하다. hCE 모델을 CO_2 배양기에서 꺼낸 후 2 시간 이내에 시험물질 처리를 완료해야 한다. 챔버 내부의 배지를 500 μL의 시험물질 용액으로 교체하고, 시험물질 처리 후 3분 동안 10초 간격으로 R model 값을 측정한다. 각 시험에서 각각의 대조 물질 용액 및 시험물질 용액에 대해 적어도 3개의 hCE 모델이 사용되어야 한다. 시험 물질의 안자극성은 한 번의 시행 결과로 예측된다.

28. 재현성을 보장하기 위해, 시험물질 용액을 처리한 후 2초에서 5초 사이에 측정을 시작해야 한다. 시험물질 용액을 처리한 후 전극 주위의 액체가 최대 2초 동안 불안정한 경우가 많으므로 측정을 시작하기 전 최소 2초의 대기 시간이 필요하다. 그러나 hCE 모델의 TEER 값은 시험물질 용액을 처리한 후 5초가 경과하면 TEER 값이 변하기 때문에 시험물질 용액 처리 후 5초가 지나기 전에 측정을 시작해야 한다.

29. hCE 모델과 시험물질 용액의 온도는 시험물질 노출 시험을 진행하는 동안 28±2 °C로 유지하기위해서는 핫플레이트(hot plate)나 항온수조(water bath) 또는 에어컨을 사용할 수 있다. hCE 모델 외부 배양액의 실제 온도를 측정하여 hCE 모델의 온도를 확인할 수 있다.

예측 모델

30. 시험물질에 노출된 후 hCE 모델의 TEER 값은 "hCE 모델에서의 TEER 값 측정" 섹션에 제공된 공식을 사용하여 계산된다. 세 가지 시험 모두에 대한 평균 TEER 값은 지연 시간(t1), 강도(-[P2-P1] / [t2-t1]) 및 안정기 수준(100-P2)의 세 가지 지표를 사용하여 분석한다. 부록 4에서는 hCE 모델을 시험물질에 노출시킨 후 나온 TEER 값을 분석할 수 있는 그래프를 제시한다. 각 지표의 점수를 계산한다. 만약 지표의 점수에서 지연시간은 180 초 초과, 강도는 초당 0.05% 미만 및 안정기 수준이 5.0% 이하인 경우 시험물질은 UN GHS에 따라 분류 및 표시가 필요하지 않은 것(No Category)으로 간주한다(표 1 참조). 이 경우 다른 시험법으로도 더 이상 추가 시험할 필요가 없다고 여겨진다. 각 지표의 점수가 지연 시간은 180 초 이하 또는 강도는 초당 0.05% 이상 또는 안정기 수준이 5.0% 초과인 경우에는 표 1에서 제시된 바와 같이 '판정 보류'로 분류한다. 그 이유는 진양성인 경우 UN GHS 카테고리 1과 2를 구분할 수 없기 때문이다. 또한 Vitrigel-안자극 시험법은 위양성 비율이 높다. 위의 두 경우 모두 통합독성평가 지침문서(3)에 따르면 분류를 위해서는 추가 정보나 시험이 필요하다.

표 1 : UN GHS 분류에 따른 예측 모델*

기준	예측치
지연 시간 ≤ 180 초 또는 강도 ≥ 0.05%/초 또는 안정기 수준 > 5.0%	판정 보류[1] (No Prediction Can Be Made)
지연 시간 > 180 초 그리고 강도 <0.05%/초 그리고 안정기 수준 ≤ 5.0%	비자극성 물질 (No Category[2])

참고사항:

1) '판정 보류'는 통합독성평가 지침문서(3)에 따라 분류를 위해서는 추가 정보가 필요한 화학물질에 해당함

2) No Category'은 UN GHS에 따라 심각한 안손상/안자극에 대한 분류가 필요하지 않은 화학물질에 해당함

*분류를 할 때에는 GD263에 요약된 기존 데이터와 지식을 바탕으로 안독성에 대한 시험물질과 관련된 가능한 모든 메커니즘을 고려해야 함

허용 기준

31. 다음 4 가지 기준이 모두 충족되면 시험에 적용할 수 있다고 판단한다.

a) 음성 대조물질 : 안정기 수준 ≤ 5%

b) 양성 대조물질 : 안정기 수준 ≥ 40%

c) 표준참조물질 : 안정기 수준 ≥ 10%

d) 각 시험물질에 대한 TEER 값의 전체 평균 표준 편차는 ≤ 15%

검증 연구에서 양성 대조물질에 대한 과거의 결과 범위는 65%에서 90% 이다.

시험결과 및 보고

시험결과

32. 각각의 hCE 모델에서 얻은 TEER 값, 각 지표의 점수 및 Vitrigel-안자극 시험법에 의해 얻은 최종 예측값을 기록해야 한다.

시험보고서

33. 시험물질은 다음과 같은 정보들을 포함하여야 한다.

시험물질과 대조 물질

- 단일성분물질: 화학물질의 정보(IUPAC 또는 CAS 등록명, CAS 등록번호, SMILES 또는 InChI 코드, 구조식 및/또는 다른 식별자료)
- 다성분 화합물, UVCB 및 혼합물: 가능한 모든 구성물질의 화학적 정보(위 참고), 순도, 양적 비율과 적절한 물리화학적 특성(위 참고) 등의 정보
- 물리적 상태, pH, 휘발성, 분자량, 화학적 분류, 시험수행과 관련된 추가적인 물리화학적 특성
- 순도, 불순물에 대한 적절한 화학물질 정보
- 시험 전처리 방법(예, 가온)
- 저장 조건 및 안정성(가능한 상세히)

시험법 조건과 방법

- 시험의뢰기관, 시험기관, 및 연구책임자의 이름과 주소 등
- 사용된 시험방법에 대한 설명

- 사용된 시험방법의 세부사항
- 사용된 세포주, 출처, 시험에 사용된 세포의 계대수 및 포화도
- 시약 공급업체, 카탈로그 번호 및 로트번호
- hCE 세포를 계대배양한 시간 및 날짜, 트립신 처리 시간, 세포의 희석 비율
- hCE 모델 준비를 위해 진행한 각 단계의 기간
- TEER 측정 시스템에 대한 QC 점검 자료
- 시험물질 용액에 대한 기록(예, 시험물질 무게, 배양액 부피, 혼합 방법 및 시험물질의 용해도, 시험물질의 pH)
- 노출시험 시작 시 hCE 모델과 시험물질 용액의 온도
- hCE 모델의 로트 번호
- CO_2 배양기에서 hCE 모델을 꺼내 시험물질을 처리한 시간
- TEER 측정 시스템으로 TEER 측정을 시작한 시간
- 시험물질의 농도(권장되는 농도와 다른 경우)
- 시험물질 처리 시간(권장되는 기간과 다른 경우)
- 각 시험에 사용된 hCE 모델 수 및 시험 횟수(권장되는 것과 다른 경우)
- 시험방법의 수정사항에 대한 설명
- 시험법 사용 전 숙련도 물질의 시험을 통해 숙련도를 입증하는 문서

결과

- 각 시험물질 및 대조 물질에 대한 각 hCE 모델의 물질 처리 전 TEER 값 및 3분 동안 시험물질에 노출시킨 후의 시간 의존적 TEER 값, 3개 지표의 점수, 시험물질의 생체 외(*in vitro*) 예측값에 대해 표 형식으로 기록해야 한다.
- 관찰된 다른 영향에 대한 설명

시험결과의 토의

결론

참고문헌

1. United Nations UN (2017). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Seventh revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117131-0. Available at: [http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev07/English /ST_SG_AC10_30_Rev7e.pdf].
2. OECD. (2017). Test No. 405: Acute Eye Irritation/Corrosion. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
3. OECD (2018). Guidance Document No. 263 on Integrated Approaches to Testing and Assesment (IATA) for Serious Eye Damage and Eye Irritation. Publications, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
4. OECD. (2017). Test No. 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
5. OECD. (2018). Test No. 438: Isolated Chicken Eye Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
6. OECD (2017). Test No. 460: Fluorescein Leakage Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
7. OECD (2018). Test No. 491: Short Time Exposure *In vitro* Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
8. OECD (2018). Test No. 492: Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
9. Takezawa T, et al. (2011). Development of a human corneal epithelium model utilizing a collagen vitrigel membrane and the changes of its barrier function induced by exposing eye irritant chemicals. Toxicol *in Vitro* 25, 1237 – 1241.
10. Yamaguchi H, et al. (2013). Vitrigel-eye irritancy test method using HCE-T cells. Toxicol Sci 135, 347 – 355.
11. Yamaguchi H, et al. (2016). Predictive performance of the Vitrigel-eye irritancy test method using 118 chemicals. J Appl Toxicol 36, 1025-1037.

12. Reim M. (2003). The Ocular Surface: Barrier Function and Mechanisms of Injury and Repair, in Alternative Toxicological Methods (Salem H and Katz SA eds) pp. 89-108, CRC Press, Boca Raton.
13. Movahedan A, et al. (2013). Loss of Notch1 Disrupts the Barrier Repair in the Corneal Epithelium. PLoS One 8, e69113
14. Uematsu M, et al. (2007). Acute corneal epithelial change after instillation of benzalkonium chloride evaluated using a newly developed in vivo corneal transepithelial electric resistance measurement method. Ophthalmic Res. 39, 308 – 314.
15. Meloni M, et al. (2010). Occludin gene expression as an early *in vitro* sign for mild eye irritation assessment. Toxicol *in Vitro* 24, 276 – 285.
16. Mikkelson TJ, et al. (1973). Altered Bioavailability of Drugs in the eye due to drugprotein interaction. J. Pharm. Sci.1648-1653.
17. Yamaguchi H and Takezawa T. (2019). Standard Protocol for the Vitrigel-EIT method, Version 1.81e. (January 18, 2019). Available at: [http://www.jacvam.jp/files/doc/06_10/06_10_Z7.pdf].
18. VITRIGEL-EIT Validation Management Team. (2017). Validation Study of the Vitrigel-EIT method as an alternative to in vivo eye irritation testing. Study Report, Version 2.0. Available at: [http://www.jacvam.jp/files/doc/06_10/06_10_Z1.pdf, http://www.jacvam.jp/files/doc/06_10/06_10_Z2.pdf, http://www.jacvam.jp/files/doc/06_10/06_10_Z3.pdf, http://www.jacvam.jp/files/doc/06_10/06_10_Z4.pdf].
19. Vitrigel-EIT method Peer Review Panel. (2017). Vitrigel-Eye Irritation Test (EIT) method Report of the Peer Review Panel. Available at: [http://www.jacvam.jp/files/doc/06_10/06_10_Z6.pdf].
20. ECETOC. (1998). Eye Irritation Reference Chemicals Data Bank. Technical Report (No. 48. (2)), Brussels, Belgium.
21. National Institute of Environmental Health Sciences. (2010). Appendix J: NICEATM Analysis: Reduced Eye Hazard Labeling Resulting from Using Globally Harmonized System (GHS) Instead of Current U.S. Regulatory Classification Criteria. ICCVAM Test Method Evaluation Report: Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products, National Institutes of Health Publication No. 10-7553, National Institutes of Health (2010): http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/invitro-2010/appj-analysis.pdf.
22. ICCVAM. (2013). Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review

Document. NIH. Available at:
http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf.

23. Farré R, et al. (2008). Short exposure of oesophageal mucosa to bile acids, both in acidic and weakly acidic conditions, can impair mucosal integrity and provoke dilated intercellular spaces. Gut 57, 1366-1374.
24. Oshima, et al. (2012). Acid modulates the squamous epithelial barrier function by modulating the localization of claudins in the superficial layers. Lab. Invest 92, 22- 31.
25. OECD (2018), Guidance Document on Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP), Series on Testing and Assessment No. 286. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
26. OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 34. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
27. Takezawa T, et al. (2004). Collagen vitrigel: a novel scaffold that can facilitate a three-dimensional culture for reconstructing organoids. Cell Transplant 13, 463 – 473.
28. Takezawa T, et al. (2007). Reconstruction of hard connective tissue utilizing a pressed silk sheet and type-I collagen as the scaffold for fibroblasts. Tissue Engineering 13, 1357 – 1366.
29. Takezawa T, et al. (2007). A protein-permeable scaffold of a collagen vitrigel membrane useful for reconstructing crosstalk models between two different cell types. Cells Tissues Organs 185, 237 – 241.
30. Takezawa T, et al. (2007). Collagen vitrigel membrane useful for paracrine assays *in vitro* and drug delivery systems in vivo, Journal of Biotechnology 131, 76 – 83.
31. Takezawa T, et al. (2008). A novel culture model of rabbit corneal epithelium utilizing a handy scaffold of collagen vitrigel membrane and its cryopreservation, Alternatives to Animal Testing and Experimentation 13, 176.

부록 1 – 용어 정의

정확도(Accuracy): 시험결과와 참고치의 일치 정도. 시험 수행에 대한 평가 척도이고 "상관성(relevance)"의 한 측면이다. 정확도는 정확하게 맞춘 시험결과의 비율을 의미하는 "일치성(concordance)"와 같은 의미로 종종 쓰임(26).

적용가능영역(Applicability domain): 시험법을 적용할 수 있는 물질의 물리화학적 및 기타 특성에 대한 설명(26).

상향식 접근방식(Bottom-Up approach): 안자극 또는 심한 안 손상에 대한 분류가 필요하지 않은 것으로 추정되는 시험물질에 사용되는 단계적 접근법. 양성의 결과가 나오는 다른 화학물질로부터 음성의 결과가 나오는 분류 및 표시가 필요하지 않은 화학물질을 구별하는 것으로 시작함(3).

화학물질(Chemical): 물질이나 혼합물을 뜻함.

콜라겐 비트리겔 막(Collagen vitrigel membrane, CVM): 생체 내에서 결합 조직을 구성하는 고밀도 콜라겐 섬유로 구성된 막으로 핀셋으로 쉽게 다룰 수 있다. 또한, 투명도와 투과도가 우수한 고분자 단백질로 이루어져 있어 이상적인 세포 배양 지지대(27~31)를 제공한다. CVM 챔버는 시판되는 콜라겐 제로겔 막 챔버로 제조된다.

유효 표면적(Effective surface area): CVM 챔버의 바닥 표면적.

안자극(Eye Irritation): 물질이나 혼합물질 적용 후 나타나는 눈의 변화로 완전히 회복될 수 있는 것을 의미한다(1).

위음성율(False negative rate): 시험법에 의해 음성물질로 잘못 판정되는 양성물질의 비율이며, 시험법 수행 지표 중 하나임(26).

위양성율(False positive rate): 시험법에 의해 양성물질로 잘못 판정되는 음성물질의 비율이며, 시험법 수행 지표 중 하나임 (26).

유해성(Hazard): 건강이나 생태계에 유해한 영향을 줄 가능성. 유해한 영향은 특정 수준 이상으로 노출되는 경우에만 나타난다 (26).

hCE(human corneal epithelium): 인체 각막 상피

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

MoA(mode of action): 작용 기전

단일성분물질(Mono-constituent substance): 정량적 조성으로 정의되며, 하나의 주요 구성성분이 최소 80% (w/w)이상인 물질.

다성분물질(Multi-constituent substance): 정량적 조성으로 정의되며 두가지 이상의 주요 성분의 농도가 10% (w/w) 이상(≥), 80% (w/w) 미만(<)인 물질. 다성분물질은 생산과정의 산물이다. 다성분물질과 혼합물 혼합물과 다성분 물질의 차이는 혼합물은 두 가지 화학반응이 없는 두 가지 이상의 물질을 섞어서 얻는 반면 다성분물질은 화학반응의 산물임.

음성대조물질(Negative control): 시험계의 모든 구성성분을 포함하며 양성반응을 일으키지 않는 물질로 처리한 군. 시험물질을 처리한 군 및 다른 대조군과 같이 실험하며 hCE 모델의 내구성을 확인하기 위해 사용됨.

유사시험법평가기준(Performance Standards): 과학적으로 검증된 시험법에 기반하여 제안된 시험법이 검증된 시험법과 기술적, 기능적으로 유사한지 그 정도를 평가하기 위해 제공되는 기준. (1)시험법의 필수 구성요소, (2)검증된 시험법이 수행에 적합하다는 것을 증명하기 위해 사용된 시험물질들 중에서 고른 최소한의 참조물질 목록, (3) 최소한의 참조물질 목록을 이용하여 제안된 시험법을 평가하였을 때 이 시험법이 증명해야 하는 정확성 및 신뢰성의 수준 등을 포함한다. 정확성 및 신뢰성은 기존의 검증된 시험법에서 얻어진 수준을 근거로 한다(26).

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

표준참조물질(Reference control): 시험계의 모든 구성요소를 포함하며 시험계에서 중간 정도의 반응을 유도한다고 알려진 물질로 처리한 군. 시험물질 및 다른 대조군과 같이 실험하며 hCE 모델의 품질을 확인하기 위해 사용됨.

상관성(Relevance): 시험과 관심효과의 관련성 및 시험이 특정 목적에 의미있고 유용한 지에 대한 설명. 상관성은 시험이 얼마나 관심 생물학적 효과를 정확하게 측정하고 예측하는 지 나타내며 또한 시험법의 정확성(일치성)을 내포함 (26).

신뢰도(Reliability): 동일한 시험방법에 따라 반복시행하였을 때 동일 실험실과 다른 실험

실에서 시험 결과를 재현할 수 있는 정도. 신뢰도는 실험실 내, 실험실 간 재현성(reproducibility)과 실험실 내 반복성(repeatability)으로 평가됨 (26).

반복실험(Run): 하나 이상의 시험물질 및 동시에 시험되는 .음성대조물질과 양성대조물질, 표준참조물질으로 구성된 시험의 시행 단위

민감도(Sensitivity): 시험법이 양성/활성 시험물질을 정확하게 분류하는 비율. 시험물질의 분류를 결정하는 시험법에 대한 정확성의 척도이며 시험법의 상관성을 평가하는데 중요한 고려사항임 (26).

심한 안손상(Serious eye damage): 눈에 물질이나 혼합물을 처리한 후 나타나는 완전히 회복되지 않는 안 조직 손상 또는 심각한 물리적 시력 감퇴(1).

특이도(Specificity): 시험법이 음성/비활성 시험물질을 정확하게 분류하는 비율. 시험법의 범주 결정에 대한 정확성의 척도이며 시험법의 상관성을 평가하는데 중요한 고려사항임 (26).

물질(Substance): 생산과정을 통해 얻어지거나 또는 자연상태로 얻는 화학 원소들(elements)과 이들로 이루어진 구성물질(compound). 생산품의 안정성을 유지시키는데 필요한 모든 첨가제와 생산과정에서 유래하는 불순물을 포함하지만 해당물질의 안정성이나 그 조성의 변화에 영향을 주지 않고 분리될 수 있는 용매는 제외시킨다 (1).

시험물질(Test chemical): 시험 물질이라는 용어는 시험 대상 물질을 지칭하는데 사용됨

단계적 시험전략(Tiered testing strategy): 시험물질에 대한 기존의 모든 정보를 순차적인 순서에 따라 검토하는 단계적인 시험전략. 다음 단계로 진행하기 전에 위험분류를 결정하기 위한 충분한 정보가 있는가를 각 단계별로 가중치를 두어 검토한다. 예를 들어, 만약 어떤 시험물질의 자극 가능성을 기존 자료를 근거로 평가할 수 있다면, 추가적인 시험을 할 필요는 없다. 하지만 어떤 시험물질의 자극 가능성을 기존 자료를 근거로 평가할 수 없다면, 명백하게 분류를 할 수 있게 되기 전까지는 순차적인 단계의 동물실험이 수행되어야 한다 (26).

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

TEER(Transepithelial electrical resistance): 상피 또는 상피 세포층의 전기 저항. 각막 상피 밀착연접(tight junction)의 접합성을 평가하기에 적절한 수단(지표)으로 간주됨.

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

UN GHS Category 1: 심한 안손상/회복되지 않음 (1).

UN GHS Category 2: 안자극/다시 회복 가능함 (1).

UN GHS Category 2A: 눈에 자극성임 (1).

UN GHS Category 2B: 눈에 약한 자극성임 (1).

UN GHS No Category: UN GHS Category 1 또는 2 (2A 또는 2B)로 분류되지 않은 화학물질.

UVCB(Substances of unknown or variable composition, complex reaction products or biological materials): 조성이 알려져 있지 않거나 다양한 조성으로 이루어진 화합물, 복잡한 반응산물, 또는 생물학적 물질.

VRM(Validated Reference Method): 검증된 참고시험법

부록 2 – Vitrigel 안자극 시험법의 숙련도 확인용 시험물질 (Proficiency chemicals)

본 가이드라인에서 설명한 방법을 일상적으로 사용하기 전에 실험실은 표 2에 수록된 10개의 화학물질의 안구 유해성 등급을 정확하게 분류하여 기술적 숙련도를 입증하여야 한다. Vitrigel 안자극 시험법 결과는 검증 연구에서 관찰된 대표적인 사례를 제시한다 19). 물질을 선택할 때에는 가능한 한 다음과 같은 화학물질을 포함한다.

(i) UN GHS 분류체계를 기반으로 한 생체 내 심각한 안손상/안자극 반응 카테고리의 전체 범위(즉, 카테고리 1, 2A, 2B 또는 카테고리 없음)를 포괄하는 물질
(ii) 생체 내 토끼 안자극 시험법(OECD TG 405)에서 얻은 고품질 결과를 기반으로 하는 물질(2)
(iv) 검증연구에서 사용된 넓은 범위의 화학물질과 유기 작용기를 포괄하는 물질 (19)
(v) 고품질 Vitrigel-EIT 데이터를 기반으로 한 생체 외 반응의 범위를 포괄하는 물질
(vi) VRM에서 정확하고 재현 가능한 예측값을 생성하는 물질
(vii) 시판되는 물질
(viii) 취득 또는 처분에 막대한 비용이 들지 않는 물질

열거된 화학물질이 이용가능하지 않거나 다른 정당한 이유로 사용할 수 없는 경우 위에서 설명한 기준을 충족하는 다른 화학 물질로 대체해야 한다(예: Vitrigel 안자극 시험법의 검증에 사용되었거나 유사시험법평가기준(Performance Standards)에 참고물질로 등재된 화학 물질)(OECD, 2019).

표 2: Vitrigel 안자극 시험법에서 추천되는 숙련도 확인용 시험물질 (Proficiency chemicals)

1) CASRN과 물리화학적 특성

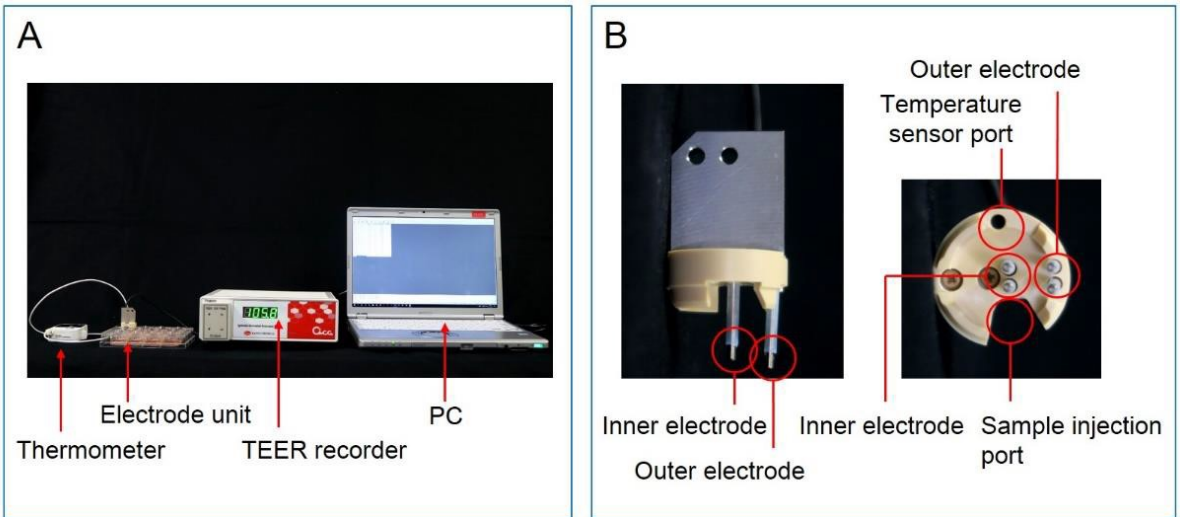
	Chemical Name	CASRN	Organic Functional Group	Physical State	pH
	In vivo UN GHS Category 1[1]				
1	3-(2-Aminoethylamino) propyl]trimethoxysilane	1760-24-3	Silicon compound	Liquid	10
2	Tetraethylene glycol	17831-71-9	Acrylate, Ester	Liquid	7
3	Butanol	71-36-3	Alcohols	Liquid	8
	In vivo UN GHS Category 2A[1]				
4	gamma-Butyrolactone	96-48-0	Heterocyclic compounds, Ketones	Liquid	7
5	Cyclopentanol	96-41-3	Alcohols	Liquid	7
	In vivo UN GHS Category 2B[1]				
6	2-Methyl-1-pentanol	105-30-6	Alcohols	Liquid	7
7	Ethyl-2-methylacetoacetate	609-14-3	Esters	Liquid	7
	In vivo UN GHS No Category[1]				
8	iso-Octyl acrylate	29590-42-9	Acrylates	Liquid	7
9	2-(n-Dodecylthio) ethanol	1462-55-1	AcrylatesAlcohol, Ether, Sulfur compound	Liquid	7
10	iso-Octylthioglycolate	25103-09-7	Thiocompound, Ester	Liquid	7

2) 시험 결과

Chemical Name		Time lag(seconds)[2]			Intensity(%/seconds)[2]			Plateau level (%)[2]			Prediction[3]
		Mean ±SD	Min.	Max.	Mean ±SD	Min.	Max.	Mean ±SD	Min.	Max.	
In vivo UN GHS Category 1[1]											
1	3-(2-Aminoethylamino) propyl]trimethoxysilane	0±0	0	0	0.36±0.05	0.33	0.41	64±8	60	73	No Prediction Can Be Made
2	Tetraethylene glycol	7±12	0	20	0.23±0.02	0.20	0.24	40±5	35	43	No Prediction Can Be Made
3	Butanol	0±0	0	0	0.29±0.03	0.27	0.33	52±6	49	59	No Prediction Can Be Made
In vivo UN GHS Category 2A[1]											
4	gamma-Butyrolactone	3±6	0	10	0.22±0.01	0.21	0.23	40±3	37	42	No Prediction Can Be Made
5	Cyclopentanol	0±0	0	0	0.37±0.09	0.28	0.30	52±2	51	55	No Prediction Can Be Made
In vivo UN GHS Category 2B[1]											
6	2-Methyl-1-pentanol	0±0	0	0	0.37±0.09	0.26	0.42	66±16	48	75	No Prediction Can Be Made
7	Ethyl-2-methylacetoacetate	3±6	0	10	0.22±0.03	0.19	0.25	41±6	34	46	No Prediction Can Be Made
In vivo UN GHS No Category[1]											
8	iso-Octyl acrylate	>180	>180	>180	0.00±0.01	-0.01	0.00	0±0	0	0	No Category
9	2-(n-Dodecylthio) ethanol	>180	>180	>180	-0.03±0.03	-0.05	0.00	0±0	0	0	No Category
10	iso-Octylthioglycolate	>180	>180	>180	-0.01±0.01	-0.02	0.00	1±1	0	2	No Category

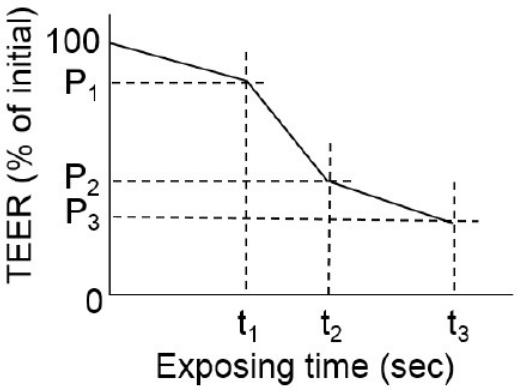
CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number
UN GHS = United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals
VRM = Validated Reference Method.
1) 생체 내 토끼 안자극 시험법(OECD TG 405) (2) 및 UN GHS의 결과에 근거함. (1, 2)
2) Vitrigel-EIT 방법 (19)의 검증 연구를 통해 얻은 결과에 근거함. 각 점수는 3반복실험에서 얻은 데이터로 계산되었다. 각 반복실험에 3개의 hCE 모델이 사용되었다.

부록 3 - TEER 측정 시스템의 사진



TEER 측정 시스템(A) 및 전극 장치(B).

부록 4 - 모델에 시험물질을 처리한 후의 TEER 프로파일 분석 그래프



Time lag (second) = t_1

Intensity (% / second)= $-(P_2 - P_1)/(t_2 - t_1)$

Plateau level (%)= $100 - P_2$

t1 (초); 0 ≥ dP/dT> -0.03%/초로 유지되는 최대 시간
t2 (초); dP/dT ≤ -0.03%/초로 유지된 후 프로파일이 0 ≥ dP(P3-P2)/dT(t3-t2) > -0.03%/초로 유지되는 초기 시간
t3 (초); t2 + 30 초 (안정기 수준은 30초 동안 평가되므로)
P1 (%); 0초의 TEER 값에 대한 t1의 TEER 값의 백분율
P2 (%); 0초의 TEER 값에 대한 t2의 TEER 값의 백분율
P3 (%); 0초의 TEER 값에 대한 t3의 TEER 값의 백분율
dP/dT; P를 T로 미분한 값