



흡입독성시험 가이드라인의 소개



안전보건공단 산업안전보건연구원
병리검사부 전문위원

이미주

동물실험은 사람에게 직접 적용할 수 없는 물질의 독성을 확인하기 위한 필수 불가결한 부분이다. 그리고 독성시험 가이드라인 (Test Guideline, 이하 TG)은 실험동물을 이용한 독성시험을 수행할 때, 동물윤리를 준수하고 신뢰성 있는 결과를 도출하기 위한 실험 방법을 제시한 지침서이다. TG는 미국환경보건청, 한국식약처, 일본후생성 등 국가별 규제기관마다 각자의 기준을 제시하고 있다. 그 중에서도 세계적으로 많이 사용하고 표준이 되는 것은 경제협력기구(Organization for Economic Cooperation and Development, 이하 OECD)에서 제시한 가이드라인이다. 화학물질 평가를 위한 OECD TG는 주제별로 5개 섹션(section)으로 나누어져 있다. 섹션 1은 physical-chemical properties, 섹션 2는 effects on biotic systems,

섹션 3은 degradation and accumulation, 섹션 4는 health effect, 섹션 5는 other test guidelines이다. 동물을 이용한 독성시험 가이드라인은 섹션 4에 속한다. 섹션 4에서는 시험 종류별, 투여 경로별, 투여 기간별로 기준을 제공한다. 흡입독성시험을 위한 OECD TG는 급성(TG 403, 436), 28일(TG 412), 90일(TG 413) 시험의 기준이 있다. 가이드라인은 시대적, 과학적 필요성에 따라 제/개정을 통해 업데이트된다. 현재는 독성시험에 대한 TG 중, 급성시험(TG 433), 28일(TG 412), 90일(TG 413) 시험에 대한 가이드라인이 제/개정 심의 중에 있다.

TG 403은 급성 흡입 독성 시험의 기준을 제공한다. 개정안이 2009년 9월 7일 승인되었다. TG 403은 정량적인 위험성 평가에서 필요한 치사량 데이터를 제공하고 물질의 분류가 가능하도록 급성 독성시험에서 충분한 정보를 얻기 위한 목적으로 디자인되었다.

동물 사용을 줄이고 규제의 요구를 충족시킬 수 있도록 고안되었으며, 두 가지 시험유형이 있다. 하나는 전통적인 LC₅₀(Lethal Dose) protocol이고, 다른 하나는 농도(concentration) x 시간(Time) (C x t) protocol이다. 빈사상태이거나 명확한 통증이나 증상을 보이는 개체는 인도적으로 안락사해야 하며, 사망한 동물과 동일한 방식으로 시험결과 해석에 적용한다. 노출 조건 및 노출 환경을 명확히 하고 기록해야 하며, 전통적인 protocol과 C x t protocol 중 선택한다. 전통적인 protocol은 sighting study, limit test, main study로 분류된다. Sighting study는 시험물질의 potency 평가, 성별 감수성 차이 확인, limit test나 main study의 노출 농도 설정을 보조하기 위해 수행한다. Limit test는 시험물질이 알려져 있거나 독성이 없을 것으로 예측될 때, 즉, 제한 농도 이상을 노출하여 독성반응을 끌어낼 때 사용한다. Main study는 군별로 암수 각 5마리를 사용하며, 농도는 최소 3개를 설정한다. 다음 농도에서 노출은 이전에 시험한 동물의 생존을 확인할 때까지 지연된다. 시험책임자는 다음 노출군의 노출 농도를 조절할 수 있다. C x t protocol은 sighting study, initial concentration, main study

OECD TG

Section 1

physical-chemical properties

Section 2

effects on biotic systems

Section 3

degradation and accumulation

Section 4

health effect



동물을 이용한 독성시험 가이드라인

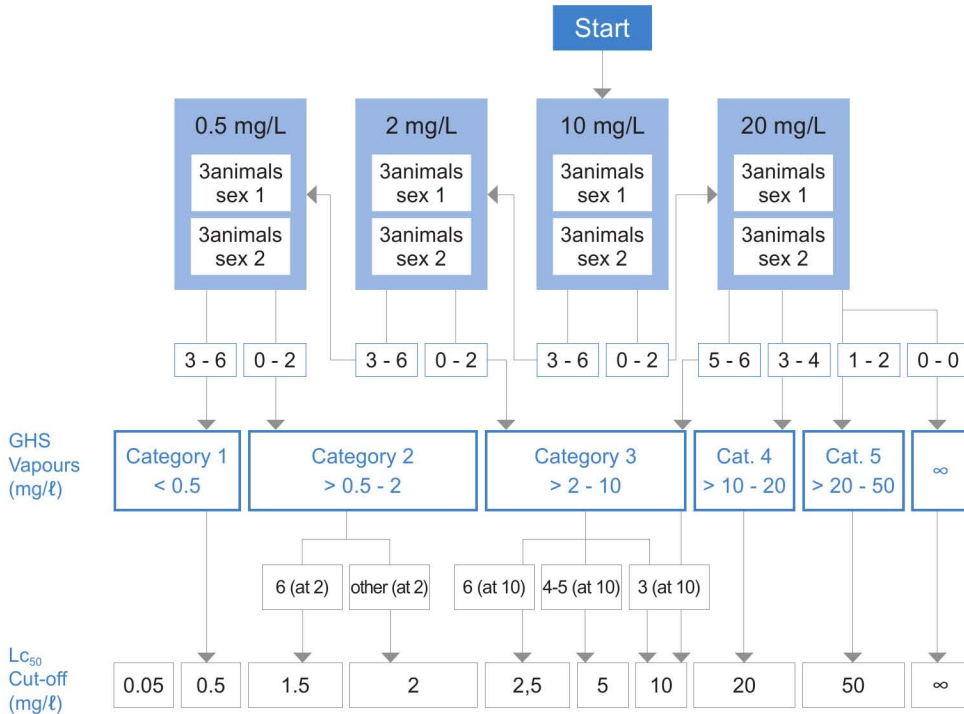
Section 5

other test guidelines

ANNEX 2c

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 10 mg/L/4h for vapours



- 3 ● + 3 ○, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
- 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentration
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: Unclassified
- Testing at 50 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)

〈그림 1〉 OECD TG 436에 따라 증기 10 mg/L/4h의 농도로 시작하는 시험절차 모식도

로 분류된다. Initial concentration은 시작 농도가 제한 농도이거나 시험책임자가 선택한 농도이다. 군당 성별로 1마리씩 15, 30, 60, 120, 240분 등 노출 시간을 달리하여 노출시킨다. Main study의 최초 농도는 sighting study에 근거하여 시험책임자가 선택하거나 제한 농도를 선택한다. Exposure Session I 동안 혹은 그 후에 동물이 사망한다면, 치사를 유발하는 최소 노출(C_xt)은 Exposure Session II의 노출 기간과 농도를 설정하는 가이드가 된다. 이처럼 각 연속된 exposure session은 이전 session에 의존한다. 노출 기간 동안 일반증상과 체중을 기록해야 하며, 관찰완료 후 부검을 실시한다.

TG 436은 Acute Toxic Class (ATC) method에 의한 급성 흡입독성 시험의 기준을 제공한다. 2009년 9월 7일 승인되었다. ATC method는 농도의 4개의 기본농도를 설정하고, 물질 형태별로 정해진 농도를 단계적으로 동물에게 노출시킨 후 그 영향을 평가하는 방법이다(그림 1). 가스(gas)는 100, 500, 2500, 20000ppm, 증기(vapor)는 0.5, 2.0, 10, 20 mg/L, 에어로졸(aerosol, 연무)은 0.05, 0.5, 1, 5 mg/kg을 기준으로 한다. 시작 노출 농도는 시험책임자가 판단에 따라 선택할 수 있다. 단계별로 암수 각 3마리씩을 사용한다. 만약 한쪽 성이 다른 성보다 더 감수성이 있다면, 더 감수성 있는 한쪽 성만 사용할 수 있다. 노출 조건과 노출 환경을 측정 및 기록해야 하고, 일반증상, 체중, 부검을 실시한다.

TG 412는 28일 아급성 흡입독성시험에 대한 기준이다.

2009년 9월 7일에 개정안이 승인되었다. 28일간의 반복 노출 시 나타나는 시험 물질의 독성을 완전히 특징짓고, 정량적인 흡입 위험성 평가를 위한 데이터를 제공하기 위해 설계되었다. 군당 암수 각 5마리씩, 하루 6시간씩 28일간 시험물질을 노출한다.

군은 1개의 대조군과 3개 이상의 시험물질 노출군으로 구성된다. 시험물질은 보통 일주일에 5일을 노출하지만, 일주일에 7일 노출도 허용된다. 만약 암수의 감수성이 다르다면 노출농도 설정을 다르게 해도 무방하다.

시험책임자의 판단에 따라 가역성을 보기 위한 회복군을 둘 수도 있고, 기관지폐포세척요법(BronchoAlveolar Lavage, BAL), 신경학적 검사, 추가적인 임상병리나 조직병리학적 평가를 수행할 수 있다. 28일 반복시험은 급성 시험과는 다르게 노출 농도는 규정되어 있지 않다.

최대 농도는 1) 최대 노출 가능 농도, 2) “최악의 경우” 사람 노출 수준, 3) 적절한 산소 공급을 유지할 위한 요구도, 4) 동물 복지를 고려하여 설정한다. 용량설정을 위한 적절한 데이터가 없는 경우 최대농도는 급성시험의 최대 농도를 사용할 수도 있다(가스: 20000ppm, 증기 20 mg/L, 에어로졸 5 mg/L). 투여농도, 입자 크기 분포, 시험물질 조제 등의 노출 조건이 명확해야 하고, 챔버 공기 흐름(airflow), 챔버 온도($22 \pm 3^\circ\text{C}$)와 습도(30~70%), nominal concentration, actual concentration, 입자 크기 분포 등 노출 환경을 측정하고 기록해야 한다. 일반증상, 체중, 사료섭취량, 임상병리검사, 장기중량 측정, 조직병리검사를 수행해야 하며, 음수섭취량 및 노검사는 선택적으로 측정할 수 있다.

임상병리검사는 혈액학적 검사와 혈액생화학적 검사로 나누는데, 혈액학적 검사에서는 적혈구 수, 헤마토크리치, 헤모글로빈 농도, 평균 적혈구 헤모글로빈량, 평균 적혈구 용적, 평균 적혈구 헤모글로빈 농도, 망상적혈구 수, 백혈구 수, 백혈구 분별계수, 혈소판 수, 응고능 검사를 실시하며, 혈액생화학적 검사에서는 혈당, 총 콜레스테롤, 중성지방, 혈액요소질소, 총 빌리루빈, 크레아티닌, 총 단백, 알부민, 글로부린, 알라닌 아미노기전이효소, 아스파탐산 아미노기전이효소, 알칼

리성 인산가수분해 효소, 칼륨, 나트륨, 칼슘, 인, 염소를 측정한다.

장기중량은 부신, 뇌, 심장, 신장, 간, 폐, 비장, 고환, 흉선을 측정한다. 부검 및 육안적인 소견 관찰은 전신의 장기조직 및 외관에 대해 실시하며, 조직병리학적 검사는 부신, 골수, 뇌, 심장, 신장, 후두, 간, 폐, 림프절, 비인두 조직, 식도, 난소, 정낭, 척수, 비장, 위, 고환, 흉선, 갑상선, 기관, 자궁 및 관찰된 육안소견에 대하여 실시한다.

TG 413은 90일 아만성 흡입독성시험에 대한 기준이다.

TG 412와 마찬가지로 2009년 9월 7일 개정안이 승인되었다. 90일간의 반복 노출 시 나타나는 시험 물질의 독성을 완전히 특징짓고, 정량적인 흡입 위험성 평가를 위해 탄탄한 데이터를 제공하기 위한 목적으로 설계되었다. 군당 암수 각 10마리씩, 하루 6시간씩, 90일간 시험물질을 노출한다. 28일 흡입 시험과 동일하게 1개의 대조군과 3개 이상의 시험물질 노출군으로 구성된다. 동물들은 보통 5일/1주의 빈도로 시험물질에 노출되지만, 7일/1주일의 노출도 허용된다.

노출 농도를 암수 동일하게 하는 것이 일반적이지만, 암수의 감수성이 다르다면 노출농도를 다르게 설정해도 무방하다. 시험책임자의 판단에 따라 물질의 독성을 더 잘 규명할 수 있도록 회복군을 두거나, BAL, 신경학적 검사, 임상병리 및 조직병리학적 검사 항목을 추가할 수도 있다. 28일 시험과 동일하게 용량설정부터, 노출 조건, 노출 환경, 일반증상, 체중, 사료섭취량, 임상병리검사, 장기중량 측정, 조직병리검사를 수행해야 하며, 음수섭취량 및 뇨검사는 선택적으로 측정할 수 있다.

다만 장기중량에서 추가적으로 난소, 갑상선, 자궁의 중량을 측정하고, 대동맥, 맹장, 결장, 십이지장, 대퇴 및 무릎관절, 담낭, 회장, 공장, 유선(암컷), 대퇴부 골격견, 췌장, 부갑상선, 말초신경, 뇌하수체, 전립선, 직장, 침샘, 피부, 흉골, 방광에 대한 조직병리학적 검사를 추가적으로 실시한다.

TG 403, 436, 412, 413에 따라 수행한 시험의 보고서는 공통적으로 실험동물과 사육관리, 시험물질, 부형제, 흡입챔버, 노출 데이터, 시험 조건, 결과 고찰과 결과 해석의 정보를 포함해야 한다. 독성 시험 가이드라인은 법률처럼 강제성이 있는 것은 아니지만, 수행한 실험 결과의 정확성과 신뢰성을 부여해주는 도구로서 유용하게 활용할 수 있다. 🐾