

심포지움 I

전임상시험 기준

좌장 : 김 부 영

- 일반 독성 시험
- 특수 독성 시험
- 생식 독성 시험
- 유전 독성 시험
- 면역 독성 시험
- 종합 및 질의

의약품등의 독성시험 기준

국립보건안전연구원 고시 제94-3호, 1994. 4.14.

제 1조 (목적)

이 규정은 의약품등 화학물질의 안전성평가를 위하여 실시하는 비임상 독성시험의 표준적인 실시방법을 정함으로써 시험결과와 신뢰성을 확보하여 의약품등의 안전성 평가에 적정을 기하는 데 있다.

제 2조 (정의)

① 시험동물이라 함은 건강동물로서 시험목적으로 사용되는 품종이 확실한 것을 말하며, 설치류는 특정병원체부재 (SPF)동물을 사용함을 원칙으로 한다.

② 급성독성시험이라 함은 시험물질을 시험동물에 단회 투여하였을때 단기간내에 나타나는 독성을 질적, 양적으로 검사하는 시험을 말한다.

③ 아급성·만성 독성시험이라함은 시험물질을 시험동물에 반복 투여하여 중, 장기간 내에 나타나는 독성을 질적, 양적으로 검사하는 시험을 말한다.

④ 생식독성시험이라함은 시험물질이 시험동물의 생식기능 전반 뿐만 아니라 다음 세대의 분화, 발생, 성장 및 기능 발달등에 미치는 영향에 관한 시험으로 수태능 및 일반생식독성시험, 최기형성시험, 주산기·수유기시험등이 있다.

가. 수태능 및 일반생식독성시험 이라 함은 임신전 및 임신초기의 암수동물의 생식세포형성, 발정주기, 교미행동, 배란, 수정, 착상 및 임신초기의 배자발생은 물론 태자의 발육지연, 기형발생, 출생자의 신체성장발달 및 행동발달 등을 검사하는 시험을 말한다.

나. 최기형성시험이라 함은 태자의 기관형성기에 배자 및 태자의 사망, 태자의 발육지연, 기형발생등의 이상을 검사하는 시험을 말한다.

다. 주산·수유기 시험이라 함은 태자의 기관형성기 이후부터 이유기까지의 임신동물의 분만, 수유 및 임신말기의 태자발달, 다음세대 동물의 출생후 성장이나 기능 발달에 미치는 영향을 검사하는 시험을 말한다.

⑤ 발암성시험이라 함은 시험물질을 시험동물에 장기간 투여하여 암(종양)의 유발여부를 질적, 양적으로 검사하는 시험을 말한다.

⑥ 유전독성시험이라 함은 시험물질의, 유전자 또는 유전자의 담체인 염색체에 대한 상해작용을 검사하는 시험을 말한다.

⑦ 흡입독성시험

흡입독성시험이라 함은 기체, 휘발성 물질, 증기 및 에어로솔 물질을 함유하고있는 공기를 시험동물에 흡입투여하여 나타나는 독성을 검사하는 시험을 말한다.

⑧ 국소독성시험

국소독성시험이라 함은 시험물질이 피부 또는 점막에 국소적으로 나타내는 자극을 검사하는 시험으로서 피부자극시험 및 안점막자극시험이 있다.

⑨ 면역독성시험이라 함은 시험물질이 면역계에 작용하여 나타나는 이상면역반응을 검사하는 시험을 말한다.

⑩ LD₅₀(50% 치사량)치라 함은 시험물질을 시험동물에 투여하였을때 시험동물의 반수가 죽는 투여량을 말한다.

11 최대내성용량이라 함은 시험물질을 시험동물에 투여하였을때 대조군에 비하여 10%이내의 체중증가 억제 또는 상승을 나타내면서 사망에 영향을 미치지 않는 독성 증상이 나타날 것으로 기대되는 최소용량을 말한다.

12 무해용량이라 함은 시험물질을 시험동물에 투여하였을때 시험동물에 어떠한 독성 증상도 나타나지 않을 것으로 기대되는 최대용량을 말한다.

13 확실증독량이라 함은 시험물질을 시험동물에 투여하였을때 독성이 명확하게 나타나는 최소용량을 말한다.

14 무영향량이라 함은 시험물질을 시험동물에 투여하였을때 독성이 나타나지 않는 최대용량을 말한다.

제 3조 (급성독성시험)

- ① 시험동물은 2종 이상으로 하고 그중 1종은 설치류, 1종은 비설치류이어야 하며, 설치류는 1군에 암수 각각 5마리이상, 비설치류는 암수 각각 2마리 이상으로 한다.
- ② 투여경로는 경구 및 비경구투여로 하고, 원칙적으로 임상적용경로를 포함하도록 한다. 경구투여는 원칙적으로 강제투여로 하고, 통상 투여전 일정시간 동물을 절식 시킨다. 그러나 인체적용경로가 정맥내 투여로만 사용될 경우 그 경로로만 실시할 수도 있고 또한 비설치류의 경우에는 임상적용경로로만 실시 하여도 된다.
- ③ 용량단계는 시험물질의 LD₅₀ 또는 개략의 치사량을 구하기에 적절한 단계를 설정 한다.
- ④ 관찰기간은 통상 경구투여시에는 2주간으로 하고, 비경구투여시에는 1주간으로 하되, 명확한 증상이 지속되거나 사망이 지연될때는 그 이상으로 한다.
- ⑤ 시험결과에는 다음 사항이 포함되어야 한다.
 - 가. LD₅₀치 (설치류에 한하고, 비설치류는 개략의 치사량도 가능함)
 - 나. 임상증상의 매일 관찰기록
 - 다. 시험기간중 3회 이상의 체중 측정기록
 - 라. 관찰기간 종료후 육안적 해부소견
 - 마. 육안적 이상소견이 관찰된 장기조직에 대하여 필요시 병리조직 검사

제 4조 (아급성·만성독성시험)

- ① 시험동물은 2종 이상을 사용하여야 하며, 그중 1종은 설치류, 1종은 비설치류로 하고, 설치류는 1군에 암수 각각 10마리 이상, 비설치류는 암수 각각 3마리 이상으로 한다.
- ② 투여경로는 원칙적으로 임상적용경로에 준한다.
- ③ 투여기간은 의약품으로서의 임상사용 예상기간에 따라 다음과 같이 정하고, 시험 물질투여는 1일 1회 주 7회 투여함을 원칙으로 한다.

임상사용예상기간	독성시험투여기간
1회 또는 1주간 이내의 연속투여	1 개월
1주를 초과하여 4주간까지 연속투여	3 개월
1개월 (4주간)을 초과하여 6개월까지 연속투여	6 개월
6개월을 초과한 장기연속투여 또는 특히 필요하다고 인정되는 경우	12 개월

④ 용량단계는 적어도 3단계의 시험물질 투여군으로 하고, 최대내성용량 및 무해용량 등을 포함하여 용량반응관계를 산출할 수 있도록 설정한다. 대조군은 음성대조군과 필요에 따라 비투여대조군, 양성대조군을 둔다.

⑤ 시험결과는 다음 사항이 포함되어야 한다.

가. 일반증상, 체중, 사료섭취량, 물섭취량

모든 시험동물에 대하여 일반증상을 매일 관찰하고, 정기적으로 체중 및 사료섭취량을 측정하며, 필요한 경우 물섭취량을 측정한다.

측정빈도는 다음과 같이 정한다.

- 체 중 : 투여개시전, 투여개시후 1개월까지는 매주 2회 이상, 3개월까지는 적어도 매주 1회, 그 후에는 4주에 1회 이상 측정한다.
- 사료섭취량 : 투여개시후 1개월까지는 매주 2회 이상, 3개월까지는 적어도 매주 1회, 그 후에는 4주에 1회 이상 측정한다. 단, 시험물질을 혼합하여 투여할 경우에는 매주 1회 측정하며, 설치류의 경우에는 개별 또는 군별로 측정할 수 있다.
- 물섭취량 : 필요에 따라 측정하며 측정시 그 횟수는 사료섭취량 측정방법에 준한다.

나. 혈액검사

설치류는 부검 (중간도살군도 포함)시에, 비설치류는 투여개시전과 부검시에, 1개월을 초과하는 시험에서는 투여기간중에 적어도 1회 채혈하여 검사한다. 검사는 원칙적으로 모든 시험동물에 대해서 행할 수 있으나, 실시상의 이유로 각군의 일부 동물에 한할 수도 있다. 검사는 혈액학적검사 및 혈액생화학적 검사 항목중 가능한 많은 항목에 대하여 실시하는 것이 바람직 하다. 통상 실시되고 있는 검사항목은 다음과 같다.

검사항목은 시험물질의 특성에 따라 적절한 항목을 선정하되, 국제적으로 널리 사용되는 항목과 검사방법을 고려하여 선정한다.

- 혈액학적 검사 : 적혈구수, 백혈구수, 혈소판수, 혈색소량, 헤마토크리트치, 백혈구백분율, 혈액응고시간, 망상적혈구수등
- 혈액생화학적 검사 : 혈청 (혈장)단백, 알부민, A/G비, 혈당, 콜레스테롤, 트리글리세라이드, 빌리루빈, 요소질소, 크레아티닌, 트랜스아미나제(AST, ALT), 알칼리포스파타제, 염소, 칼슘, 칼륨, 무기인등.

다. 뇨검사

설치류는 각 군마다 일정수의 동물을 선정하여 투여기간중 1회이상, 비설치류는 각군 전부에 대해서 투여개시전과 투여기간중 1회 이상 뇨검사를 실시한다. 검사에는 아래와 같은 항목이 자주 선정된다.

뇨량, pH, 단백, 당, 케톤체, 빌리루빈, 잠혈, 침사등

라. 안과학적 검사

설치류에서는 투여기간중 적어도 1회, 각 군마다 일정수의 동물을 선정하여 안과학적 검사를 실시한다. 또한 비설치류에서는 투여전 및 투여기간중 적어도 1회 각 군 모두에 대해서 안과학적 검사를 실시한다. 검사는 육안 및 검안경으로 실시하고 전안부, 중간투광체 및 안저의 각각에 대해서 실시한다.

마. 기타 기능검사

필요에 따라 심전도, 시각, 청각, 신기능 등의 검사를 실시한다.

바. 병리조직검사

- 생존 및 사망한 모든 동물의 장기중량을 측정한다. 원칙적으로 측정하여야 할 장기는 심장, 간장, 비장, 신장, 부신, 전립선, 정소, 난소, 뇌 및 하수체이고, 폐, 타액선, 흉선, 갑상선, 정낭, 자궁에 대하여도 측정하는 경우가 많다.
- 설치류는 고용량군 및 대조군에 대해, 비설치류는 모든 시험동물군에 대해 병리조직학적 검사를 실시한다. 다만, 설치류에서 육안소견상 용량에 따른 변화가 인정되거나 고용량군에서 관찰 소견상 필요하다고 인정되는 경우 기타 용량군의 해당 장기 조직에 대해 병리조직학적 검사를 실시하되, 원칙적으로 검사하여야 할 장기조직은 다음과 같다. 다만, 육안소견등의 판단에 의해 적절히 삭감 또는 추가 할 수도 있다.

피부, 유선, 임파절, 타액선, 골 및 골수 (흉골, 대퇴골), 흉선, 기관, 폐 및 기관지, 심장, 갑상선 및 상피소체, 혀, 식도, 위, 및 십이지장, 소장, 대장,

간장 및 담낭, 췌장, 비장, 신장, 부신, 방광, 정낭, 전립선, 정소, 난소, 자궁, 질, 뇌, 허수체, 척수, 안구 및 그 부속기, 기타 육안적 병변이 관찰된 장기조직등.

사. 확실증독량 및 무영향량

⑥ 회복성 시험

독성변화의 회복성과 지연성 독성을 검토하기 위해 1개월 또는 3개월 시험에서는 필요에 따라 회복군을 두어 시험하는 것이 바람직하다.

제 5조 (발암성시험)

① 시험동물은 2종 이상으로 하고, 6주령까지의 동일 주령의 동물을 사용한다. 동물수는 암수 각각에 대하여 1군 50마리 이상으로 한다.

② 용량단계는 암수 각각에 대하여 3단계 이상의 시험군을 설정하고 별도로 대조군을 둔다. 시험군에 있어서 최고 용량은 독성증상을 나타내는 양으로서 동물이 장기 생존가능하다고 생각되는 최대량으로 하고, 저용량은 독성증상이 나타나지 않는 양으로 사람의 최대사용량 또는 사용동물중에서 약리적 효과를 나타내는 양으로 하며, 중간용량은 고용량과 저용량과의 등비중량으로 한다. 대조군은 음성대조군과 필요에 따라 비투여 대조군, 양성대조군을 둔다.

③ 투여경로는 원칙적으로 임상적용경로로 하고, 경구투여의 경우에는 강제투여 또는 사료, 물등에 혼입하여 자유롭게 섭취시키도록 하며 사료에 혼입하여 투여하는 경우 사료중 시험물질의 농도는 최고 5% 까지로 한다.

④ 투여기간은 랫드에서는 24개월 이상 30개월 이내, 마우스 및 햄스터에서는 18개월 이상 24개월 이내로 하고, 투여는 1일 1회, 주 7회 투여함을 원칙으로 한다.

⑤ 관찰기간은 시험물질 투여 종료시 또는 투여 종료후 1-3개월까지로 한다. 저용량군 또는 음성대조군의 누적사망율이 75%가 되는 경우 그 시점에서 생존동물을 도살하여 시험을 종료한다.

⑥ 검사방법은 다음과 같다.

가. 각 군의 모든 동물에 대해서 일반 증상을 매일 관찰하고, 체중을 부여개시후 3개월간은 주 1회 이상, 그후는 4주에 1회 이상 측정한다.

나. 시험기간중의 사망례에 대해서는 신속히 부검하여 기관 조직의 육안적 관찰 및 병리조직학적 검사를 실시한다.

다. 시험기간중에 가사상태의 시험동물에 대해서는 신속히 도살 부검하여 기관 조직의 육안적 관찰 및 병리조직학적 검사를 실시한다. 또한 도살시 필요에 따라 혈액을 채취하여 적혈구수 및 백혈구수를 측정하고, 도말검체를 제작하여 빈혈이나 임파절·간장·비장의 종대 등 혈액질환이 예상되는 동물에 대해서는 도말검체를 검사한다.

라. 관찰 종료시의 생존례에 대해서는 각 군의 모든 동물에 대하여 기관 조직의 육안적 관찰을 실시한다. 병리조직학적 검사는 최고용량군 및 대조군의 모든 동물에 대해서 실시한다. 단, 최고용량군과 대조군과의 사이에서 종양발생에 차이가 있는 기관 조직에 대해서는 기타 시험군의 모든 동물에 대해서도 해당기관 조직의 병리조직학적 검사를 실시한다. 또한 도살시 필요에 따라서 혈액을 채취하여 적혈구수 및 백혈구수를 측정하고 도말검체를 제작하여, 빈혈이나 임파절, 간장, 비장의 종대 등 혈액질환이 예상되는 예에 대해서는 도말검체를 검사한다. 육안적으로 확인되는 모든 종양성 병변이외의 전부에 대해서는 원칙적으로 검사하여야 할 장기조직은 다음과 같다. 다만 육안적 소견등의 판단에 의해 적절히 삭감 또는 추가 할 수도 있다. 피부, 유선, 임파절, 타액선, 흉골, 추골 또는 대퇴골(골수포함), 흉선, 기관, 폐 및 기관지, 심장, 갑상선 및 상피소체, 혀, 식도, 위 및 십이지장, 소장, 대장, 간장, 췌장, 비장, 신장, 부신, 방광, 정낭, 전립선, 정소, 난소, 자궁, 질, 안구, 뇌, 하수체, 척수, 기타 육안적으로 종양성 병변이 관찰된 장기조직등.

제 6조 생식독성시험

원칙적으로 모든 시험물질에 대하여 수태능 및 일반생식독성시험, 최기형성시험, 주산·수유기시험을 실시한다. 생식독성시험에 사용하는 시험동물은 동일한 종을 사용하는 것이 바람직하다.

가. 수태능 및 일반 생식독성시험

① 시험동물은 랫드 또는 마우스등 1종 이상으로 한다.

- ② 동물수는 1군당 암수 각각 20마리 이상으로 한다.
- ③ 용량단계는 최소 3단계로 설정한다. 최고용량은 최대내성용량으로 하고 최소용량은 무해용량으로 한다.
- ④ 대조군으로 음성대조군을 두며, 필요에 따라 비투여대조군 및 양성대조군을 들 수 있다.
- ⑤ 투여경로는 원칙적으로 임상투여경로를 적용한다.
- ⑥ 투여기간은 숫컷의 경우 생후 40일 이상된 것에 60일 이상 투여하고 계속해서 동거기간 및 부검시까지 투여하며, 암컷의 경우 성숙된 것에 교배 14일 전부터 시작하여 동거기간, 교미성립 후 임신 전기간 및 분만 후 이유때까지 투여한다.
- ⑦ 검사방법은 시험기간중 각군 모두에 대해 그 생사 및 일반증상을 관찰하고 체중 및 사료섭취량을 측정한다. 필요에 따라 물섭취량을 측정한다. 암컷의 1/2은 임신 말기에 부검하여 임신지수(황체수, 착상수, 흡수수, 태자의 사망여부, 생존태자의 체중, 성별 등)를 산출하고, 생존태자의 외포이상, 골격 및 내부장기의 기형을 검사한다. 나머지 1/2은 출산시켜 신체의 성장발달 및 행동발달에 관한 검사를 하며 차세대 생식기능검사도 실시한다. 교배에 사용되는 숫컷 및 교미가 성립안된 암컷은 적당한 시기에 부검하여 육안적 병리소견을 검사한다. 필요에 따라 최고용량투여 숫컷과 비투여암컷, 최고용량 암컷과 비투여 수컷에 대한 교차교배를 실시한다. 교차교배 결과 숫컷의 수태능력에 영향이 있는 것으로 판단되면 부검하여 교환, 부교환의 조직병리학적 소견 및 정자의 활성, 형태등을 관찰한다.

나. 최기형성 시험

- ① 시험동물은 랫드나 마우스등의 설치류와 토끼등의 비설치류중 각 1종씩 2종 이상을 사용한다.
- ② 동물수는 랫드나 마우스등의 설치류는 1군당 임신 암컷 20마리 이상으로 하고, 토끼 등 비설치류는 1군당 임신 암컷 12마리 이상으로 한다.
- ③ 용량단계는 최소 3단계로 설정한다. 최고용량은 최대내성용량으로 하고 최소용량은 무해용량으로 한다.

④ 대조군은 음성대조군을 두며, 필요에 따라 비투여대조군 및 양성대조군을 둘 수 있다.

⑤ 투여경로는 원칙적으로 임상투여경로를 적용한다.

⑥ 투여기간은 태자의 기관형성기 (주로 마우스는 임신 6일에서 15일까지, 랫드는 임신 6일에서 16일까지, 토끼는 임신 6일에서 18일까지) 에 매일 투여한다.

⑦ 시험동물의 임상증상은 교미 확인일로부터 부검시까지 매일 관찰한다. 시험동물의 체중 및 사료섭취량은 임신일로 부터 부검시까지 측정한다. 시험동물은 각군 전부를 임신말기에 부검하여 임신지수(황체수, 착상수, 흡수수, 태자의 사망여부, 생존 태자의 체중, 성별 등)를 산출하고, 생존태자의 외표이상, 골격 및 내부장기의 기형을 검사한다. 모체의 각 기관의 육안적 이상 유무를 관찰하고 필요한 경우 병리조직학적 검사를 한다.

다. 주산·수유기 시험

① 시험동물은 랫드 또는 마우스등 1종 이상으로 한다.

② 동물수는 한군당 임신 암컷 20마리 이상으로 한다.

③ 용량단계는 최소 3단계로 설정한다. 최고용량은 최대내성용량으로 하고 최소용량은 무해용량으로 한다.

④ 대조군으로 음성대조군을 두며, 필요에 따라 비투여대조군 및 양성대조군을 둘 수 있다.

⑤ 투여경로는 원칙적으로 임상투여 경로를 적용한다.

⑥ 투여기간은 태자의 기관형성기를 지난 시기부터 이유기까지 (주로 마우스는 임신 15일에서 분만후 21일, 랫드는 임신 16일에서 분만후 21일) 매일 투여한다.

⑦ 검사방법은 관찰 기간중 각군 모두에 대해 사망여부 및 일반증상을 관찰하고 체중 및 사료섭취량을 측정한다. 각 군의 모든 동물을 분만, 포육시킨다. 진통 및 분만에 대해 주의하여 관찰한다. 임신기간, 출생자의 생사, 신생자의 체중, 외표이상, 사산자의 골격검사, 모체의 수유, 포육본능에 대한 영향등을 조사한다. 출생자

는 신체성장발달 및 행동발달에 관한 검사를 한다. 그밖의 특이한 증상의 유무를 관찰하고 필요한 경우 생식기능검사를 한다. 모체는 수유가 끝나고 도살후 철저한 부검을 실시한다.

제 7조 (유전독성시험)

원칙적으로 모든 시험물질에 대하여 *Salmonella typhimurium* 복귀돌연변이시험 및 포유류의 배양세포를 이용하는 염색체 이상시험, 설치류를 이용하는 소핵시험을 실시한다.

단, 시험물질의 특성 및 시험의 실시목적등을 고려하여 필요하다고 인정되는 경우에는 그 밖의 유전독성시험을 실시한다.

① *Salmonella typhimurium*을 이용하는 복귀돌연변이시험

가. 균주는 *Salmonella typhimurium* TA1535, TA1537, TA98, TA100등을 이용하여 필요에 따라 다른 균주를 대체 또는 추가할 수 있다.

나. 용량단계는 5단계 이상을 설정하며 최고용량은 항균성을 나타내지 않는 경우에는 원칙적으로 5mg/plate를 한도로 한다. 매 용량마다 2매 이상의 플레이트를 사용한다.

다. S9mix를 첨가한 대사활성법을 병행하여 행한다. S9은 랫드에 적절한 약물대사효소계의 유도체를 투여한 후 간장으로부터 조제하며, 이 S9에 보호소등을 넣은 S9mix를 이용한다.

라. 음성대조군은 원칙적으로 용매를 사용한다. 양성대조군은 이미 알려진 변이원물질 (S9mix를 필요로 하지 않는 물질과 필요로 하는 물질)을 사용한다.

마. 결과의 판정은 복귀변이집락수가 용량의존적으로 증가하고 그 수가 음성대조군의 2배 이상이거나 통계학적 유의성을 나타낼때 양성으로 판정한다.

② 포유류의 배양세포를 이용하는 염색체 이상시험

가. 사람 또는 포유동물의 초대 또는 계대배양세포를 사용한다.

나. 시험물질의 최고용량은 세포중식(또는 분열)이 약 50% 억제되는 농도로 하고 세포독성이 관찰되지 않는 경우는 10mM상당의 농도를 한도로 한다. 용량단계는 3단계 이상을 설정한다.

다. S9mix등 적절한 대사활성화법을 병행한다.

라. 염색체 표본은, 직접법의 경우 시험물질처리 후 24시간 또는 48시간 경과시기에 만들며, 대사활성화법의 경우에는 시험물질의 처리시간을 6시간으로하고 다시 정상배지에서 18시간 배양 후 표본을 제작한다.

마. 염색체이상의 검색은 농도당 100개의 분열증기상에 대하여 염색체의 구조이상 및 숫적이상을 가진 세포의 출현빈도를 구한다. 구조이상에 대하여는 염색분체 및 염색체에 나타나는 구조이상의 종류를 명기한다.

바. 음성대조는 원칙적으로 용매대조로 한다. 양성대조로서는 이미 알려진 염색체이상 유발물질을 이용한다.

사. 결과의 판정은 염색체이상의 수가 통계학적으로 유의성있게 용량의존적으로 증가하거나, 하나 이상의 용량단계에서 재현성있게 양성반응을 나타낼 경우를 양성으로 한다.

③ 설치류를 이용하는 소핵시험

가. 시험동물은 마우스나 그 밖의 설치류를 사용한다.

나. 1군당 적어도 성숙한 수컷 6마리를 사용한다. 시험물질의 특성에 따라 암컷을 사용할 수도 있다.

다. 용량단계는 3단계 이상으로 한다. 최고용량은 예비시험으로 결정하되 LD₅₀의 1/2을 기준으로 복강내투여 또는 임상적용 경로로 1회 투여를 원칙으로 하며 필요에 따라 24시간 간격으로 2-5회 연속투여한다. 투여용량의 선정이유를 명기한다.

라. 음성대조군은 원칙적으로 용매를 사용한다. 양성대조군은 이미 알려진 소핵유발물질을 사용한다.

마. 시험물질투여후 적절한 시기에 도살하여 골수도말표본을 만든다. 표본은 시험물질 투여후 특정의 시간 (18-72시간)에 행하는 방법이 일반적이나 경시적으로 수회 행하는 방법도 있다. 원칙적으로 개체당 1,000개의 다염성적혈구에 대해서 소핵의 유무를 검색한다. 동시에 전적혈구에 대한 다염성적혈구의 출현빈도를 구한다.

바. 결과의 판정은 소핵을 가진 다염성적혈구의 수가 통계학적으로 유의성있게 용량 의존적으로 증가하거나, 하나 이상의 용량단계에서 재현성있게 양성반응을 나타낼 경우를 양성으로 한다.

④ *Escherichia coli*를 이용하는 복귀돌연변이시험

가. 균주는 *Escherichia coli* WP 2, WP 2 uvrA⁻, WP 2 uvrA⁻ pKM 101을 이용한

다.

나. 용량단계의 설정등 세부사항은 ①항의 기준과 같다

⑤ 포유류의 배양세포를 이용하는 유전자돌연변이시험

가. 세포주는 L5178Y 마우스임파종세포, 차이니즈햄스터 유래의 CHO 또는 V79계 세포등을 이용한다.

나. 적절한 대사활성화법을 병행하여 행한다.

다. 3단계이상의 용량단계를 설정하며 최고농도는 50% 세포증식억제 농도로 한다. 세포독성이 나타나지 않는 경우에는 10mM상당의 농도를 한도로 한다. 난용성 물질은 용해한계로 한다. 음성(용매)대조군과 적절한 양성대조군을 둔다.

라. 시험물질의 처리시간은 적정시간 (대부분의 경우 1-5시간)으로 하며 1세포주기 이상 연장할 수 있다.

마. 유발변이의 표현형발현을 위하여 최적에 가까운 발현기간을 부여하여야 한다.

바. 결과의 판정은 돌연변이 발생빈도가 통계학적으로 유의성있게 용량의존적으로 증가하거나 적어도, 하나 이상의 용량단계에서 재현성 있게 양성반응을 나타내는 경우를 양성으로 한다.

⑥ 설치류를 이용하는 우성치사시험

가. 시험동물은 성숙한 랫드 또는 마우스를 사용한다.

나. 시험동물의 수는 생물학적 특성의 자발변이를 고려하여 결정한다. 통상 1군당 수컷의 마리수는 매 교배간격마다 30-50의 임신 암컷을 제공할 수 있을 정도로 충분하여야 한다.

다. 투여경로는 통상 복강 또는 경구로서 수컷에 투여한다.

라. 용량단계는 3단계로하며 최고농도는 수태능력의 경미한 감소 등 독성의 징후를 나타내는 농도로 한다. 비독성물질의 경우는 원칙적으로 5g/kg까지 시험한다.

마. 매실험마다 양성대조를 둔다. 동일 실험실에서 행한 최근의 양성대조의 성적이 있을 경우에는 이를 양성대조로 가름 할 수 있다.

바. 결과의 판정은 우성치사수가 통계학적으로 유의하게 용량의존적으로 증가를 나타낼 경우를 양성으로 한다.

유발우성치사율 (DL : Induced Dominant Lethality)

$$DL (\%) = \left(1 - \frac{\text{실험군의 임신 암컷당 평균 생존 태자수}}{\text{음성대조군의 임신 암컷당 평균 생존 태자수}} \right) \times 100$$

⑦ 초파리를 이용하는 반성열성치사시험

가. 초파리주는 야생형의 수컷과 Muller-5주의 암컷을 이용하며, 다중역위 X염색체를 가진 암컷도 이용할 수 있다.

나. 시험물질은 물에 용해시킨다. 물에 녹지않는 물질은 적절한 용매 (예를 들어 에탄올과 Tween-60 또는 80의 혼합액)에 녹이거나 현탁액을 만들어 사용하며 투여하기전에 물이나 생리식염수에 희석한다.

다. 시험물질의 투여는 경구, 주사 또는 가스상물질에의 노출에 의한다.

라. 3단계 이상의 용량단계를 설정하며 최고용량은 최대내량 또는 독성의 징후를 나타내는 농도로 한다. 음성(용매)대조군과 적절한 양성대조군을 둔다.

마. 반성열성치사변이의 빈도가 통계학적으로 유의한 용량의존적 증가를 나타내거나, 하나 이상의 용량단계에서 재현성있게 통계학적으로 유의한 양성반응을 나타낼 경우를 양성으로 한다.

⑧ 설치류의 골수세포를 이용하는 염색체이상시험

가. 실험동물은 랫드, 마우스, 햄스터등 설치류를 사용한다.

나. 동물수는 매시험군 및 음성(용매) 및 양성대조군 마다 암수 각각 5마리 이상으로 한다. 어느 한쪽의 성을 이용하거나 사용동물수가 다른 경우는 그 사유를 명기한다.

다. 투여경로는 통상 경구 또는 복강내 투여로 하며 그밖의 경로로도 이용할 수 있다.

라. 시험물질은 가능한 한 물 또는 생리식염수에 용해시킨다. 물에 녹지 않는 경우에는, 시험물질에 영향을 주지 않으며 독성이 나타나지 않는 용액에 녹이거나 현탁시켜 사용하며 시험 직전에 제조함을 원칙으로 한다.

마. 용량단계는 3단계로 하며, 최고농도는 최대내량 또는 유사분열의 부분적 저해 등 모종의 세포독성의 징후를 나타내는 농도로 한다. 독성이 나타나지 않는 경우에는 5g/kg을 최고농도로 한다.

바. 표본의 채취는 1회 투여의 경우 투여 후 6-48시간 범위내에서 적절한 간격을 두고 행한다. 연속투여인 경우에는 최종투여 후 6시간 및 24시간에 표본을 채취한다. 골수채취 2시간전에 colcemid를 복강주사한다.

사. 결과의 판정은 염색체구조이상의 수가 통계학적으로 유의하게 용량의존적으로 증가할 경우를 양성으로 한다.

⑨ 포유류의 세포를 이용하는 자대염색분체교환(SCE)시험

가. 사람임파구 등 초대배양세포 또는 CHO, CHL등 확립된 세포주를 이용한다.

나. 대사활성화법을 병행하여 행한다. 음성대조로는 원칙적으로 용매대조로 하고 양성대조로서는 이미 알려진 변이원물질 (대사활성화를 필요로 하지 않는 물질과 필요로 하는 물질)을 이용한다.

다. 3단계 이상의 용량단계를 설정하며, 최고용량은 상당한 독성작용을 일으키나 세포복제는 적절히 유지되는 용량으로 한다. 비교적 물에 난용성인 물질은 용해 한도까지 시험한다.

라. 염색체표본은 BrdU존재하에서 시험물질을 투여한 후 2세포주기 후 세포를 수집하여 표본을 제작한다. 슬라이드의 염색은 FPG법 등 수종의 기법을 이용하여 행한다.

마. 통상적으로 용량단계당 적어도 30개의 잘 퍼진 중기분열상으로 부터 SCE를 검출한다.

바. 세포당 SCE의 평균치가 통계적으로 유의하게 용량의존적 증가를 나타내거나, 적어도 하나 이상의 용량단계에서 재현성있게 통계적으로 유의한 양성반응을 나타낼 경우 양성으로 한다.

⑩ 마우스스포츠키시험, 효모를 이용하는 유전자돌연변이시험, 마우스를 이용하는 유전성전좌시험, 포유류의 생식세포를 이용하는 염색체이상시험, 부정기 DNA합성시험, 효모를 이용하는 체세포유전자재조합시험등 본 기준에서 그 지침을 정하지 아니한 시험에 대하여는 OECD유전독성시험지침을 참고로 하여 실시한다.

제 8조 (급성흡입독성)

① 시험동물은 원칙적으로 랫드를 사용하고 그외의 사유가 있는 경우 포유동물 중에서 선택하여 사용할 수 있다.

② 동물수는 각군당 10마리 (암수 각각 5마리)이상으로 하고, 시험당시 임신하였거나 임신경력이 있는 암컷은 사용하지 않는다.

③ 시험물질의 투여농도는 최소한 세가지 이상의 농도를 사용하고, 사용할 각 농도는 예비시험을 통하여 결정하거나 가장높은 농도는 LC₅₀값 보다는 높지만 100% 치사율을 발휘하지 않는 농도를 취하고 중간농도는 LC₅₀값 부근, 그리고 가장 낮은 농도는 LC₅₀값 보다 낮고 전혀 치사를 가져오지 않는 농도보다는 높은 농도를 취한다.

④ 대조군은 비투여군 및 용매투여군 등으로 한다.

⑤ 시험물질 투여 방법

가. 흡입챔버 (exposure chamber)를 사용하여 동물을 챔버속에 넣어 시험하거나 머리 부분만 챔버안에 넣어 시험한다.

나. 선정된 농도의 시험물질을 공기와 섞어 챔버안에 주입시키고, 이때 챔버내의 공기유량은 시간당 12 - 15회 정도가 되도록 공기주입 속도를 조절한다. 또한 산소의 비율은 19%, 온도는 22±3℃, 습도는 30-70%로 유지하여야 한다.

다. 동물을 챔버에 넣어 시험하는 경우 한마리씩 따로 사육챔버에 넣어 시험하는 것이 적합하며, 동물이 차지하는 공간은 챔버전체 공간의 5%이내가 되어야 한다.

라. 투여시간은 챔버안의 시험물질 농도가 균일하게 된 후 4-6시간으로 1회 투여한다.

마. 투여기간동안 챔버내 공기의 주입속도, 온도, 습도를 매 30분마다 기록하고 공기중 시험물질의 실제 농도는 가능하면 연속적으로 측정하되 최소한 시작과 끝, 그리고 중간에 측정하고, 분무제의 경우 입자크기의 분포를 시작과 끝, 그리고 중간에 각각 측정 하여야 한다.

⑥ 관찰기간은 14일로 하고 동물을 사육하면서 다음과 같은 시험 및 관찰을 한다.

가. 체중은 시험직전과 시험종료시 측정하고 시험기간 중에는 일주일 간격으로 측정한다.

나. 일반적 독성증세로서 피부, 모피, 안구, 점막, 호흡기계, 순환계, 자율신경계 및 중추신경계, 운동및 행동양식, 진전, 경련, 타액분비, 설사, 기면, 수면과 혼수 상태등을 사육상자 옆에서 매일 관찰한다. 증세가 나타날 경우 증세, 발병시간, 정도, 지속시간을 기록한다. 관찰기간중 사망한 동물은 부검하기 위해 냉동시키고, 쇠약한 동물은 따로 격리한다.

다. 사망동물 및 관찰기간이 끝난 생존동물에 대해서는 부검, 육안적 관찰을 실시하고 생존동물중 이상이 발견된 장기조직에 대해서는 필요시 병리조직검사를 실시한다.

⑦ 관찰된 시험결과는 LC_{50} 값과 이의 95% 신뢰도 범위로써 표현하며 일반독성 증세 및 병리조직학적 시험결과를 기록한다.

제 9조 (아급성 흡입독성시험)

① 시험동물은 마우스, 랫드, 기니픽, 토끼, 개 중 1종이상으로 한다.

② 동물수는 각 군당 20마리 (암수 각각 10마리)이상으로 하고, 개의 경우는 8마리 (암수 각각 4마리) 이상으로 한다.

③ 시험물질의 투여농도는 최소한 세가지 이상의 농도를 사용하고 가장높은 농도는 시험기간동안 LC_{10} 값 이하의 치사율을 일으키는 농도를 취하고 가장 낮은 농도는 전혀 독성증세를 나타나지 않으나 실제 사용농도 보다 높은 농도를 취한다.

④ 대조군은 비투여군 및 필요한 경우 용매투여군을 둘 수 있으며, 용매투여군의 농도는 투여군중에서 가장 높은 농도의 용매농도를 실시한다.

⑤ 시험물질 투여방법은 급성 흡입독성실험과 동일하며 시험기간은 하루 6시간씩 주당 5일로써 90일간 투여를 원칙으로 하고 시험목적에 따라 2주간 또는 28일간 투여로 할 수도 있다.

⑥ 시험결과에는 다음 사항이 포함되어야 한다

가. 매일 시험동물의 임상 관찰 결과

나. 매주 마다 시험동물의 체중 및 사료 섭취량

다. 시험종료시 시험동물로부터 혈액을 채취하여 다음 시험을 한다.

- 1) 혈액검사로서 헤마토크리트치, 적혈구수, 백혈구 수, 백혈구 백분율, 혈액 응고시간, 혈소판수등을 측정한다.
- 2) 혈액생화학적 검사로서 칼슘, 인, 염소, 나트륨, 혈당, 트랜스아미나제 (AST, ALT), γ -GT, 요소질소, 알부민, 크레아티닌, 빌리루빈, 혈청단백, 오르니틴디카복실라제를 측정하고 그외 필요에 따라 독성효과를 평가하는데 있어 지표가 될 수 있는 지질, 산, 염기도, 메트헤모글로빈, 콜린에스터라제 활성등을 측정한다.

라. 사망동물 및 관찰기간이 끝난 생존동물에 대해서는 부검 즉시 간, 신장, 부신, 고환(난소), 폐의 장기중량을 측정하고 최대용량군과 대조군에 대하여는 상기 장기 및 상부호흡기계 (기관, 비인두조직), 임파절, 타액선, 골 및 골수, 흉선, 심장, 갑상선, 부갑상선, 식도, 위, 십이지장, 소장, 대장, 간(담낭), 췌장, 비장, 심장, 부신, 방광, 고환(난소), 자궁, 뇌, 뇌하수체, 동맥, 말초신경 및 병변이 관찰된 기타 장기조직에 대해서 병리조직학적 검사를 실시하지만 육안소견으로 보아 그 필요성이 인정되지 않는다고 판단되는 경우에는 그 일부를 생략할 수 있다.

제 10조 (국소독성)

국소독성시험은 피부자극시험, 안점막자극시험으로 한다.

① 피부자극시험

가. 시험동물은 젊고 건강한 백색토끼(2.0-3.0kg)를 사용한다.

나. 시험동물은 6마리 이상을 사용하여야 한다. 필요에 따라 대조군을 둔다.

다. 부여량은 시험물질이 액체인 경우 0.5ml, 고체 또는 반고체인 경우 0.5g으로 한다.

라. 도포부위는 털깎은 등부위의 피부이고, 2.5cm × 2.5cm의 비찰과피부 2개부위와 찰과피부 2개 부위로 한다.

마. 도포 방법은 가로세로 2.5cm의 피부에 시험물질을 적용한 후 가아제로 덮고, 가아제를 테이프로 고정한다. 가아제의 위에 시험물질의 증발을 막기위해 침투성이 없고 반응성이 없는 고흥 재질의 박지로 덮고 테이프등을 사용하여 고정한다.

바. 적용부위의 관찰은 시험물질 투여후 24, 72시간에 실시하고 표 1에 의해 평가한다.

② 안점막 자극 시험

가. 시험동물은 젊고 건강한 백색토끼 (2.0-3.0kg)를 사용한다.

나. 시험동물의 양쪽 안구는 시험개시 24시간전에 미리 안검사를 실시하여 안구손상등 각막의 손상이 없어야 한다.

다. 점안량은 액체인 경우 0.1ml, 고체 또는 반고체인 경우 100mg으로 한다.

라. 시험물질을 9마리의 토끼 한쪽 눈에 점안하고, 그중 3마리는 20-30초후 양쪽 눈에 미온 무균생리식염수 20ml로 1분간 세안하고, 나머지 6마리는 세안하지 않는다.

마. 관찰은 시험물질을 투여하지 않은 다른쪽 눈을 대조로 하여, 시험물질을 투여 후 1,2,3,4,7일에 실시하여 표 2에 의해 평가하고, 그후에도 상해가 잔존하면 3일간격으로, 투여 13일 이상 행한다.

* <표1및표2>

(표 1) 피부반응의 평가

(1) 홍반과 가피형성

등급

- 홍반이 전혀없음 0
- 아주 가벼운 홍반 (육안으로 겨우 식별할 정도) 1
- 분명한 홍반 2
- 약간 심한 홍반 3
- 심한 홍반 (홍당무색의 발적)과 가벼운정도의 가피 4
- 총 가능한 홍반 점수 4

(2) 부종 형성

- 부종이 전혀 없음 0
- 아주 가벼운 부종(육안으로 겨우 식별할 정도) 1
- 가벼운 부종 (뚜렷하게 부어올라서 변연부가 분명히 구별될 경우) 2
- 보통의 부종 (약 1mm정도 부어올랐을 경우) 3
- 심한 부종 (1mm이상 부어오르고 노출부위 밖에까지 확장된 상태) 4
- 총 가능한 부종 점수 4

(표 2) 안구병변의 등급

(1) 각막

(A) 혼탁 : 안구의 농후한 정도 (가장 농후한 지점을 관찰함)

- 화농이나 혼탁이 없음 0
- 혼탁이 분산 혹은 밀집되어 있음 (정상적인 투명성이 약간 둔화된 것과는 다름)
홍채의 말단이 명확히 관찰됨 1
- 반투명한 부분이 쉽게 관측됨, 홍채의 말단이 약간 불명확함 2
- 진주 색깔을 나타냄, 홍채의 말단이 관찰안됨, 동공의 크기가 가까스로 관측됨 3
- 각막이 불투명, 혼탁 때문에 홍채가 관찰안됨 4

(B) 혼탁된 각막의 범위

- 1/4 이하 (그러나 0은 아니다) 1
- 1/4 이상 1/2 미만 2
- 1/4 이상 3/4 미만 3
- 1/4 이상 1까지 4

A×B×5

최대치 = 80

(2) 홍채	
(A) 반응치	
○ 정상	0
○ 현저한 주름의 형성, 충혈, 종창, 각막 주위에 중등도의 충혈, 이상과 같은 단독 혹은 혼합, 홍채는 빛에 대해 반응함 (둔한 반응은 양성)	1
○ 빛에 대해 반응 없음. 출혈, 대부분 파괴(이상과 같은 증상의 일부 혹은 전부)	2
A×5	최대치 = 10
(3) 결막	
(A) 발적 (안검결막, 안구결막에 한함. 각막, 홍채 제외)	
○ 혈관은 정상	0
○ 몇몇 혈관은 명확히 충혈	1
○ 넓은 심홍색 색조, 각각의 혈관은 쉽게 관찰 안됨	2
○ 넓은 선홍색	3
(B) 결막 부종	
○ 부풀지 않음	0
○ 정상보다 약간 종창 (순막 포함)	1
○ 안검의 부분적 외전을 동반한 현저한 종창	2
○ 눈이 반쯤 감길 정도의 안검의 종창	3
○ 눈이 반 이상 감길 정도의 안검의 종창	4
(C) 배출물	
○ 배출물 없음	0
○ 약간의 배출물 (정상동물의 내부 눈꼬리에서 관찰되는 작은 양 제외)	1
○ 속눈섭과 눈꺼풀을 적시는 배출물	2
○ 눈주위의 상당 부위와 속눈섭과 눈꺼풀을 적시는 배출물	3
점수 (A + B + C)×2	

제 11조 (면역독성시험)

① 항원성 시험 : 약물 알러지는 경우에 따라 인체에 심각한 위해를 줄 수 있으므로 시험물질에 대해 아나필락시스 쇼크 반응시험 및 수동 피부 아나필락시스 반응시험을 실시하여 항원성을 시험한다. 이 시험결과 항원성이 의심될 경우 간접 적혈구 응집 반응시험을 추가하여 실시한다. 단 외용제(점안제, 도포제 등)의 경우는 피부 감작시험을 실시하여 항원성을 시험한다. (주1)

가. 아나필락시스 쇼크 반응시험(주2)

- 1) 시험동물은 200-350 g의 수컷 기니픽을 사용한다.
- 2) 용량은 추정되는 임상용량으로부터 선정한다. (주3)
- 3) 투여경로는 피하, 또는 복강내로 하는 것이 일반적이나, 임상적용 경로로 투여 하여도 무방하다.
- 4) 시험군은 원칙적으로 1군당 5마리 이상으로 하여 대조군, 양성대조군 및 시험물질 투여군을 두며, 시험물질 투여군은 저용량군과 고용량군의 2군 이상으로 하고 거대분자와의 결합 여부, 면역보조제와의 혼합투여 여부에 따라 필요한 군을 설정한다. (주4)
- 5) 시험물질에 따라 거대분자와의 결합 여부를 결정하여(주4) 시험을 실시하며 용매는 0.9%(w/v) 생리식염수를 사용한다. (주5) 대조물질로는 시험물질에 따라 항원성이 알려진 저분자 물질, 또는 이종단백을 사용한다. (주4)
- 6) 모든 용액은 시험 당일에 조제하며 감작과 야기시 원하는 농도로 준비한다.
- 7) 감작시 대조군에는 0.9%(w/v) 생리식염수를 투여하고, 양성대조군에는 양성대조물질을 투여하여 감작한다. 면역보조제를 사용하지 않는 시험군에는 시험물질을 단독으로 피하, 복강내 또는 임상경로에 준하여 반복 투여 (주 2-3회, 2-4주간)하여 감작한다. 면역보조제를 사용하는 시험군에는 적당한 면역보조제와 혼합하여 피하, 복강내, 또는 피내에 적절한 간격(1-3주)으로 3회 이상 반복 투여하여 감작한다. (주4)
- 8) 최종 감작 1-3주 후에 시험물질(야기항원)을 정맥내 투여하여 아나필락시스 쇼크 증상의 발현 유무를 검색한다. 야기항원량은 원칙적으로 감작에 이용한 저용량의 수배로 한다.
- 9) 시험결과는 아나필락시스 쇼크 반응시험 판정기준에 따라 판정한다. (주6)

나. 수동 피부 아나필락시스 반응시험(주2)

- 1) 시험동물은 항혈청 제조에는 C57BL/6계 수컷 마우스(20-30 g) 또는 적당한 근교계 수컷 마우스를 사용하며, 수동 피부 아나필락시스 반응 야기에는 수컷랫드(150-350 g)를 사용한다.

- 2) 용량은 추정되는 임상용량으로부터 선정한다.(주3)
- 3) 투여경로는 피하, 또는 복강내로 하는 것이 일반적이나, 임상적용 경로로 투여 하여도 무방하다.
- 4) 시험군은 원칙적으로 1군당 5마리 이상으로 하여 대조군, 양성대조군 및 시험물질투여군을 두며, 시험물질 투여군은 저용량군과 고용량군의 2군 이상으로 하고 거대분자와의 결합 여부, 면역보조제와의 혼합투여 여부에 따라 필요한 군을 설정한다.(주4)
- 5) 시험물질에 따라 거대분자와의 결합 여부를 결정하여(주4) 시험을 실시하며 용매는 0.9%(w/v) 생리식염수를 사용한다.(주5) 대조물질로는 시험물질에 따라 항원성이 알려진 저분자 물질, 또는 이종단백을 사용한다. (주4)
- 6) 모든 용액은 시험 당일에 조제하며 감각과 야기시 원하는 농도로 준비한다.
- 7) 감각시 대조군에는 0.9%(w/v) 생리식염수를 투여하고, 양성대조군에는 양성 대조물질을 투여하여 감각한다. 면역보조제를 사용하지 않는 시험군에는 시험물질을 단독으로 피하, 복강내 또는 임상경로에 준하여 반복 투여 (주 2-3회, 2-4주간)하여 감각한다. 면역보조제를 사용하는 시험군에는 적당한 면역보조제와 혼합하여 피하, 복강내, 또는 피내에 적절한 간격(1-3 주)로 3회 이상 반복 투여하여 감각한다.(주4)
- 8) 최종 감각 1-3주 후에 채혈하여 항혈청을 개체별로 분리한다.
- 9) 수동 피부 아나필락시스 반응 야기를 위하여는 위 8)에서 얻은 개체별 항혈청을 제모한 랫드의 배부 피내에 주사한다. 항혈청은 적당한 배율까지 연속배수희석(4배, 8배, 16배, ...)해서 약 0.05-0.1 ml정도 주사하며 이때 대조군 마우스의 혈청도 동량 주사한다. 각 혈청당 2-3마리의 랫드에 주사한다. 감각시킨 랫드는 사육상자에 넣어 수용하며 24시간 후에 시험물질 (야기항원)을 랫드에 투여한다. 이때 투여할 시험물질 용액은 동량의 1-3%(w/v) Evans blue와 혼합하여 각 시험 랫드의 미정맥내에 투여한다. 야기항원량은 원칙적으로 감각에 이용한 저용량의 수배로 한다.
- 10) 야기 항원 주사 30분 후에 시험 랫드 각 개체를 경추탈골 또는 마취하에 치사시켜 배부 피부를 절취해서 뒷면으로부터 청색 반점을 관찰한다. 출현한 청색반의 장경과 단경의 평균치가 5 mm 이상이면 양성으로 하고, 양성을 나타내는 가장 마지막 혈청희석액의 희석 배수(최대 희석 배수)를 그 혈청의 최종 역가(항체가)로 정한다.

다. 간접 적혈구 응집 반응시험(주2)

- 1) 시험동물은 C57BL/6계 수컷 마우스(20-30 g) 또는 적당한 근교계 수컷 마우스를 사용한다.
- 2) 용량은 추정되는 임상용량으로부터 선정한다.(주3)

- 3) 투여경로는 피하, 또는 복강내로 하는 것이 일반적이나, 임상적용 경로로 투여 하여도 무방하다.
- 4) 시험군은 원칙적으로 1군당 5마리 이상으로 하여 대조군, 양성대조군 및 시험물질투여군을 두며, 시험물질 투여군은 저용량군과 고용량군의 2군 이상으로 하고 거대분자와의 결합 여부, 면역보조제와의 혼합투여 여부에 따라 필요한 군을 설정한다.(주4)
- 5) 시험물질에 따라 거대분자와의 결합 여부를 결정하여(주4) 시험을 실시하며 용매는 0.9%(w/v) 생리식염수를 사용한다.(주5) 대조물질로는 시험물질에 따라 항원성이 알려진 저분자 물질, 또는 이종단백을 사용한다. (주4)
- 6) 모든 용액은 시험 당일에 조제하며 감작과 야기시 원하는 농도로 준비한다.
- 7) 감작시 대조군에는 0.9%(w/v) 생리식염수를 투여하고, 양성대조군에는 양성대조물질을 투여하여 감작한다. 면역보조제를 사용하지 않는 시험군에는 시험물질을 단독으로 피하, 복강내 또는 임상경로에 준하여 반복 투여(주 2-3회, 2-4주간)하여 감작한다. 면역보조제를 사용하는 시험군에는 적당한 면역보조제와 혼합하여 피하, 복강내, 또는 피내에 적절한 간격(1-3주)으로 3회 이상 반복 투여하여 감작한다.(주4)
- 8) 최종 감작 1-3주 후에 채혈하여 항혈청을 개체별로 분리한다.
- 9) 시험물질로 피복된 면양적혈구를 조제하기 위하여는 면양적혈구에 적당한 시약 (Tannic acid, Glutaraldehyde, Chromic chloride)을 사용해서 시험물질을 결합시켜 1-1.5%(v/v) 면양적혈구 부유액을 만든다.
- 10) 간접적혈구 응집반응을 야기시키기 위하여는 개체별 항혈청을 96-Well plate에서 적당한 배율까지 연속배수희석(4배, 8배, 16배, ...)한 후 시험물질로 피복된 면양적혈구 부유액을 96-Well plate의 각 Well마다 넣고 반응시킨다.
- 11) 항혈청과 피복된 면양적혈구 부유액의 혼합액을 상온에서 2-3 시간 이상 반응시킨 후 응집 유무를 관찰한다. 응집상이 관찰된 항혈청의 최대 희석 배수를 그 항혈청의 응집가로 한다.

② 기타 면역독성 시험 : 아급성, 만성 독성시험 등의 결과 면역기능 및 면역장기의 이상이 의심될 경우(주7) 다음 가,나 시험항목(세포성 면역시험, 체액성 면역시험)에 대하여 각 1종 이상의 시험을 실시하여 면역독성에 대한 총체적 평가를 하며, 필요시 다,라 시험항목(대식세포기능시험, 자연살세포 기능시험)에 대하여 추가로 시험을 실시한다. (주8)

가. 세포성 면역시험

- 1) Concanavalin A, Phytohemagglutinin 및 특이항원에 대한 세포 유약화 시험
- 2) 혼합 백혈구 배양시험
- 3) 난백알부민, Tuberculin, Listeria 등 T 임파구 의존 항원에 의한 지연형 과민반응시험.

나. 체액성 면역시험

- 1) 비장세포의 항체 플라그 형성시험
- 2) T 임파구 의존성 항원에 대한 항체의 혈중농도 시험
- 3) T 임파구 비의존성 항원인 Lipopolysaccharide에 대한 항체의 혈중농도 시험
- 4) Lipopolysaccharide에 대한 세포 유약화 반응시험

다. 대식세포 기능시험

- 1) Listeria monocytogenes에 대한 탐식 작용시험
- 2) YAC-1 세포에 대한 Cytotoxicity 시험(마우스의 경우이며 사람의 경우는 K562 세포를 사용함)
- 3) Carbon clearance시험

라. 자연살세포 기능시험

YAC-1 세포에 대한 Cytotoxicity시험 (마우스의 경우이며 사람의 경우는 K562 세포를 사용함)

(주1) : 해당 시험물질의 특성과 임상적용법 등에서 타당한 사유가 인정되면 본 시험의 생략이 가능하다. 고분자나 단백질과 결합한다고 생각되는 시험물질에 대하여는 시험물질의 중합성 및 단백질결합 정도를 고려하여야 한다. 또한 유사 시험물질에서 특별한 항원성 및 여기에 기인한다고 의심되는 부작용이 있는 경우 교차 항원성의 가능성을 고려하여야 한다.

(주2) : 원칙적으로 본 시험 실시방법에 따라서 시험을 실시하여야 하나 세부사항에 있어서 시험의 본질에 영향을 주지 않는 한도내에서 조정이 가능하며, 동일한 목적의 다른 시험법이 실시 가능한 경우에는 다른 시험법의 적용도 가능하다.

(주3) : 감각하는 시험물질의 양은 원칙적으로 최대 임상용량 이상을 저용량으로 하고 고용량은 저용량의 수배량을 투여하며, 필요시 적당한 다른 용량의 추가도 무방하다.

(주4) :

가. 시험물질의 분자량에 따라 일반 의약품과 고분자 물질로 분류하여 시험을 실시한다. 일반 의약품의 경우 원체 단독 및 혈청알부민과 같은 거대분자와 결합된 형태로 시험을 실시하며, 고분자 물질은 그 자체로 시험을 실시한다.

나. 대조물질로는 원칙적으로 생리식염수를 사용하며, 양성대조물질은 시험물질이 일반 의약품인 경우 Aminoantipyrine 혹은 Penicillin 등과 같은 저분자 물질을 사용하거나 이중단백을 사용하고, 고분자 물질의 경우는 이중단백을 사용한다.

다. 면역보조제로는 주로 Freund's complete adjuvant(FCA)를 사용하나, 경우에 따라서 Alum 등 다른 면역 보조제를 사용할 수도 있다.

(주5) : 용매는 원칙적으로 생리식염수를 사용하며 시험물질이 비수용성인 경우 여러가지 용해보조제를 사용하여 가능한 한 고농도의 수용액의 형태로 투여한다.

(주6) : 아나필락시스 쇼크 반응시험 판정기준

-
1. 불안(Restlessness)
 2. 기모(Piloerection)
 3. 진전(Tremor)
 4. 코를 문지르거나 핥음(Rubbing or licking nose)
 5. 재채기(Sneezing)
 6. 기침(Coughing)
 7. 호흡축진(Hyperpnea)
 8. 배뇨(Urination)
 9. 배변(Evacuation)
 10. 유루(Lacrimation)
 11. 호흡곤란(Dyspnea)
 12. 짹짹거리는 소리(Rhonchus)
 13. 청색증(Cyanosis)
 14. 보행불안(Staggering gait)

15. 도약(Jumping)
16. 헐떡거리고 몸부림침(Gasping and writhing)
17. 경련(Convulsion)
18. 횡와(Side position)
19. Cheyne-Stokes 호흡(Cheyne-Stokes respiration)
20. 사망(Death)

[-] Asymptomatic : 무증상

[±] Mild : 1-4의 증상

[+] Moderate : 1-10의 증상

[++] Severe : 1-19의 증상

[+++] Death : 사망

(주7) : 이 경우 일반 독성시험 자료에 원칙적으로 혈액검사자료 및 면역장기의 중량을 포함한 병리조직학적 자료가 포함되어야 한다.

(주8) : 각 항목에 대해서 동일한 목적의 다른 시험법이 실시 가능한 경우에는 다른 시험법의 적용도 가능하며, 해당 의약품의 특성과 임상적용법 등에서 타당한 사유가 인정되면 본 시험의 생략이 가능하다.

제 12조 (보칙) 의약품등의 안전성평가에 있어서는 언제나 규정된 시험만이 요구되는 것은 아니고, 시험물질의 독성에 따라 새로운 시험이 추가 또는 부수적으로 이루어지게 되므로, 어떠한 독성시험의 결과가 인체적용을 위한 적절한 안전성평가를 할 수 있는 경우라면 이 시험법을 꼭 적용할 필요는 없는 것으로 본다.

*** 부 칙 ***

제 1조 (시행일) 이 기준은 고시일부터 시행한다.

제 2조 (경과조치) ① 이 기준 시행과 동시에 “의약품등의 독성시험기준(국립보건안전연구원 예규 제 10호)은 효력을 상실한다.

② 다만 이 기준 시행 이전에 작성된 독성시험자료가 의약품등의 안전성, 유효성 검토의뢰서로 접수될 경우에는 종전의 규정 “의약품등의 독성시험기준(국립보건안전연구원 예규 제 10호)”에 따른다.