급성독성시험법에 대한 고찰

산업안전보건공단
산업안전보건연구원
흡입독성연구센터 병리검사부장
정용현

I. 화학물질 분류를 위한 급성독성시험 종류

최근 각종 생활용품으로 사용되는 화학물질뿐만 아니라 각종 농약 등 유해성에 대한 관심이 높아지면서 유해성을 평가하는 각종 독성시험법에 대한 관심도 높아지고 있다. 독성시험은 실험동물을 주로 사용하게 되는데, 최근 동물 보호에 대한 관심이 높아지면서 동물을 이용한 독성시험법도 많은 변화를 겪어왔다.

화학물질에 대한 독성시험법은 OECD 등 국제기구나 정부기관에서 시험법을 규정하여 시험법대로 화학물질의 유해

성을 평가하도록 되어 있다. 화학물질에 대한 건강유해성 평가를 위한 대표적인 시험법으로는 OECD TG(Test Guideline)이 있다. 우리나라 환경부의 '화학물질의 등록 및 평가 등에 관한 법률' 제14조 제1항 및 동법 시행규칙 제5조 제1항에 따라 화학물질의 시험방법을 제정한 국립환경과학원 고시(제2017-4호)도 OECD TG에 따라 개정하고 있다.

최근 독성시험법은 실험동물 수를 줄이는 방향으로 개정되어 가고 있다. 이에 따라 기존에 사용되던 실험동물을 많이 사용하는 시험법은 폐기되고 새로운 독성시험법들이 개발되고 있다. 실험동물을 이용한 독성시험법 중에서 가장 간단하고 기본적인 시험법은 급성독성시험법이다. 이는 시험물질을 24시간 이내에 1회 혹은 수회 투여한 후 단시간에 나타나는 악영향(adverse effects)을 평가하는 시험으로, 급성독성시험의 결과는 화학물질을 분류하는 데 사용된다.

OECD의 화학물질 건강 유해성평가를 위한 급성경구독성시험법에는 2001년에 제정된 OECD TG 423 독성등급법, OECD TG 420 고정용량법과 2008년에 제정된 OECD TG 425 용량고저법 등이 있다. 급성흡입독성시험법에는 1981년에 제정된 전통적인 반수치사량을 사용하는 OECD TG 403 급성흡입독성시험법과 2009년에 제정된 OECD TGB 436 급성독성등급법이 있다.

Ⅱ. 급성독성시험법의 변화

1910년에 Sudmerson과 Glenny가 디프테리아(diptheria) 독성을 평가하기 위하여 기니아픽(guinea pigs)의 치사율(lethality testing)을 사용한 바 있다. 그 후 화학물질의 건강유해성 정보제공과 화학물질 분류를 위하여 급성경구독성시험법을 도입하여 시험동물의 반수치사율을 이용한 반수치사량 LD_{50}(median lethal dosage)을 산출하여 화학물질에 대한 독성 정도를 평가하여 왔다. 1984년에는 영국 독성협회(British Toxicology Society)에서 동물의 사망 수뿐만 아니라, 동일용량 시험군에서 뚜렷한 독성 발현의 유무를 판단하여 독성 정도를 결정하는 3단계 제한시험법(a three-step limit test)을 제시했다. 이 3단계 제한시험법은 Van den Heuvel 등이 20가지 화학물질에 대하여 전통적인 LD_{50}을 산출하여 화학물질을 분류한 기준과 일치율을 비교한 결과, 신뢰성이 인정되어 OECD에서 1992년에 TG 420으로 채택한 바 있다. 이 시험법의 통계적 유의성은 Whitehead 등에 의하여 평가된 바 있다.

최근 시험동물 수를 줄이고 시험동물의 고통을 줄이려는 노력이 시도되면서 OECD에서는 전통적인 반수치사량을 이용한 시험법인 TG 401 급성경구독성 시험법을 삭제하고, 1992년에 제정된 고정용량법(fixed-dose procedure) TG 420을 2001년에 새로 개정하였다. 주요 개정내용을 살펴보면, 시험물질 고정투여량을 5, 50, 500, 2,000 mg/kg에서 5, 50, 300, 2,000 mg/kg으로 조정하였으며, 개정 전의 시험법에는 예비시험용으로 각 군당 시험동물을 1마리씩 사용하고 본시험에서는 각 군별로 암수 각 5마리씩을 사용하였으나, 개정된 TG 420 시험법에서는 예비시험용 동물 수를 포함하여 각 군당 암컷 5마리로 줄였다. 개정된 TG 420 시험법의 시험수행 원칙은 적당한 투여 농도를 사용하여 시험동물이 심한 고통이나 스트레스를 받지 않도록 하며, 사망동물이 발생할 수 있는 투여 농도는 피하고, 빈사상태의 동물은 안락사 시켜 시험 중 사망동물로 간주하라고 하였다. 또한 시험수행 전에 시험물질의 구조와 특성, 물리화학적 성질, 관련 독성시험 결과, 구조적으로 관련된 물질의 독성자료, 예측되는 용도 등 시험물질 정보에 대한 충분한 검토를 거쳐 적당한 초기투여 농도를 설정하여 예비시험을 실시한 다음, 시험동물의 독성 발현 정도에 따라 계단식 고정용량을 적용하여 본시험을 수행하라고 하였다.

III. 개정된 TG 420 시험법 적용 사례

1) 예비시험 및 본시험 수행

개정된 TG 420 시험법에 의하면, 예비시험에는 각 단계별 고정용량 투여군을 각 군당 1마리씩 두며, 각 투여군당 최소 24시간의 시간 간격을 유지하여 시험물질을 투여한 후 최소 14일간 관찰하도록 되어 있으며, 예비시험 결과로 본시험의 초기투여량을 결정하도록 되어 있다. 예비시험의 초기투여량은 시험물질에 대한 특별한 정보가 없으면 300 mg/kg을 할 것을 권유하고 있다. 본시험의 각 투여 농도 단계별 투여시간은 3~4일의 간격을 유지하라고 하였다. 본시험에서는 시험물질 A의 LD_{50}이 3,250 mg/kg이라는 독성정보를 입수하여 초기투여량은 2,000 mg/kg으로 정하고, 예비시험용 동물 한 마리에 2,000 mg/kg을 투여하였다. 투여 후 24시간 동안 특별한 증상이 발현되지 않아 본시험 초기투여용량도 2,000 mg/kg으로 정하고 4마리의 시험동물에 2,000 mg/kg

을 투여하고, 4일 동안 관찰하였으나 특별한 독성 발현 증상을 보이지 않아, 5 mg/kg 군, 50 mg/kg 군, 300 mg/kg 군에는 시험물질을 투여하지 않고, 2,000 mg/kg 투여군만 14일간 임상증상을 관찰하고 체중을 측정하였다.

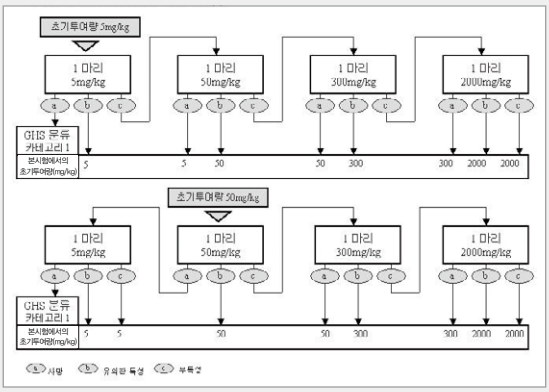
2) 시험 결과 평가 방법

개정된 TG 420 시험법에서는 예비시험 결과도 본시험의 결과해석에 포함시키고, 각 고정용량 시험군에서 뚜렷한 독성 발현(evident toxicity)이 나타날 때, 1마리 이하의 동물이 사망했을 때, 2,000 mg/kg 투여 시 독성반응이 없을 때, 5 mg/kg 투여 시 사망했을 때 등의 경우에 시험을 종료하고 시험물질을 평가하게 된다. 해당 시험군에서 3~4일 동안 특별한 독성반응이 없으면 한 단계 높은 고정용량 시험군에 정해진 시험물질을 투여하며, 2마리 이상의 시험동물이 사망하면 한 단계 낮은 고정용량 시험군에 정해진 시험물질을 투여하여 독성 정도를 다시 판단하게 된다. 만약 5 mg/kg 고정용량 예비시험에서 동물이 사망할 경우에는 정상적인 시험절차를 중지하고, 시험물질을 국제적으로 조화된 화학물질 및 혼합물의 분류 체계인 GHS(Globally Harmonized classification System for chemical substances and mixtures) Class 1로 지정하여 본시험을 수행한다. 두 번째 동물에 5 mg/kg을 투여하여 사망하면 시험물질을 GHS Class 1로 인정하고, 시험을 즉시 중단한다. 만약 두 번째 동물이 생존하면, 본 시험을 위한 3마리의 추가 동물의 투여량을 5 mg/kg으로 한다. 이때 각 투여 동물간의 시간적 간격은 충분히 유지하여, 먼저 투여한 동물의 생존 여부를 충분히 판단할 수 있어야 한다. 만약 두 번째 사망동물이 발생하면 시험을 즉시 중단하고 더 이상 동물에 시험물질을 투여하지 않고 GHS Class 1로 분류하고, 5 mg/kg을 투여한 5마리 시험동물 가운데 1마리만 사망하면, GHS Class 2로 분류한다.

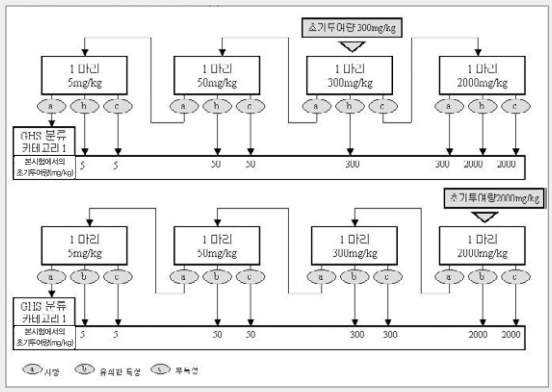
Ⅳ. 시험 결과 및 고찰

종래의 TG 420 시험법과 개정된 TG 420 시험법을 비교해 보면, 사용하는 시험동물 수는 기존 시험법에서는 예비시험에 사용하는 동물 수는 각 군당 암컷 5마리 이하, 본시험에서는 각 시험군당 암수 각각 5마리를 사용하였으나,

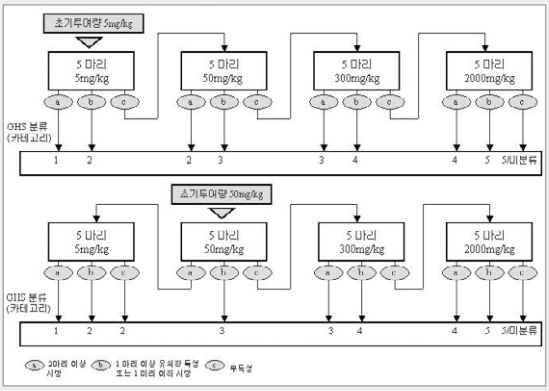
개정된 시험법에서는 예비시험용으로 각 투여 농도별로 암컷 1마리를 사용하고 예비시험에 사용된 시험동물을 포함하여 본시험에서는 각 군별로 암컷 5마리를 사용하도록 되어 있다. 즉 개정된 시험법에서는 사용하는 시험동물 수를 예비시험에서는 1/5로 줄였고, 본시험에서는 4/10로 줄였다. 투여 농도도 개정된 시험법에서는 4가지 투여 농도 중 500 mg/kg 투여 농도를 300 mg/kg 투여 농도로 낮추어 시험동물에 대한 복지 수준을 높였다. 기존의 급성독성시험은 기본적으로 시험동물의 사망수를 기준으로 독성을 평가하는 방법이다. 개정된 TG 420 시험법도 시험동물의 사망수를 기본으로 하고 있으면서도 뚜렷한 독성 발현을 보이는 시험동물에 대한 평가 기준을 마련하여 독성을 평가함



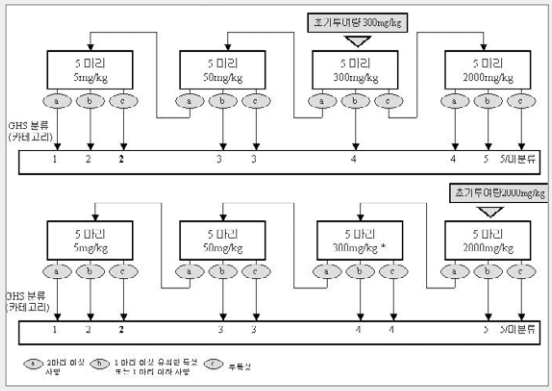
〈그림 1〉 예비시험 단계의 흐름도(1)



〈그림 2〉 예비시험 단계의 흐름도(2)



〈그림 3〉 본시험 단계의 흐름도(1)



〈그림 4〉 본시험 단계의 흐름도(2)

으로써 동물 복지를 중요시한 시험법이다. 그러나 개정된 TG 420 시험법은 투여군 간의 시험물질 투여 간격을 3~4일 두어야하기 때문에 각 시험군별 시험종료 시점이 최대 16일 정도 길어지게 된다.

개정된 TG 420 시험법의 확립과 적용방법을 검토하기 위하여 본 연구에 사용된 시험물질 A는 LD_{50}이 3,250 mg/kg으로 독성이 낮은 물질이다. 독성이 낮은 물질에 적용할 수 있는 한도시험법은 예비시험으로 시험동물 1마리에 2,000 mg/kg(특별한 경우에는 5,000 mg/kg)을 투여하고 본시험에 동일 용량을 4마리의 추가 동물에 투여하는 방법으로 시험물질이 무독성일 가능성이 많을 때 사용할 수 있는 방법이다. 본시험에서도 시험동물군 구성을 5 mg/kg, 50 mg/kg, 300 mg/kg, 2,000 mg/kg 등으로 구성하였지만, 시험물질의 독성이 낮아 2,000 mg/kg 군 5마리에만 시험물질을 투여하여 임상증상 관찰 후 시험을 종료하였다.

시험 결과 시험물질 A는 2,000 mg/kg 급성경구투여시험에서 시험물질에 의한 영향은 없는 것으로 판단되어 GHS(Globally Harmonised System) class 5/unclassified로 분류되었다. 본시험에 실제로 사용된 시험동물 수는 5마리에 불과하여 기존의 급성경구독성시험법에 비하여는 획기적으로 사용 시험동물 수를 줄였다고 할 수 있다. 개정된 TG 420 시험법을 검토한 결과, 독성이 낮을 것으로 예측되는 시험물질의 경우에는 2,000 mg/kg 농도부터 적용하여 점차 낮은 농도를 적용시키고, 독성이 높을 것으로 예측되는 시험물질의 경우에는 5 mg/kg 농도부터 적용하여 점차 높은 농도를 적용시키고, 독성자료가 충분치 않을 경우에는 중간 농도인 300 mg/kg 농도를 적용시키는 방법이 가장 동물복지를 고려하고, 시험동물 수를 줄일 수 있는 방법이 될 것으로 판단되었다. 또한 개정된 TG 420 시험법은 기본적으로 시험을 수행하기 위하여 각 군당 5마리 4개군(총 20마리)의 시험동물을 준비하게 되는데, 시험물질의 독성정도와 초기투여 농도의 선택에 따라 준비한 시험동물 중 일부만을 사용하는 경우가 생겨 잔여 동물에 대한 사용 방안을 충분히 고려하여 시험계획을 수립하여야한다.