



[2016. 3. 9.] [2016 - 22 , 2016. 3. 9.,]

() 054 - 912 - 0532

1 () 「 」 31 , 42 , 85 1 , 「 」 7 1 .
2 , " " 7 1 4

2 () " " (SPF)

" "

" "

" " 가

1

" "

"1 " , ,

, , , , 4

" "

" "

()

◎ "50% 치사량(LD₅₀)"이라 함은 검체를 시험동물에 투여하였을 때 시험동물의 반수가 죽는 투여량을 말한다.

" " 가

()

" "

가

"

"

.

,

,

.

3 ()

()

,

OECD

, VICH

.

< 2016 - 22 ,2016.3.9.>

1 ()

2 ()

2016 7 1

3

(3

6 30

)

.

【별표】

동물용의약품등의 독성시험방법(제3조관련)

본 시험방법은 동물용의약품등의 제조 및 품목허가신청 등의 목적으로 실시되는 안전성 평가를 위한 독성시험에 대하여 표준적인 실시방법을 제시하여 동물용의약품등의 안전성의 적절한 평가에 이바지 하는 것을 목적으로 한다. 그러나 본래 모든 동물용의약품등에 대하여 일률적인 시험방법을 정하는 것은 합리적이 아니고 또 시험의 진전에 따라 새로운 실험을 추가할 필요가 생기는 것도 적지 않다. 따라서 얻어진 소견이 적절한 안전성 평가에 도움이 되는 것인 한 반드시 여기에 제시된 방법을 고수하도록 요구하는 것은 아니다. 본 시험방법은 일반 동물용의약품과 사료첨가제의 독성시험방법으로 구분한다.

I. 일반 동물용의약품(사료첨가제 제외)

1. 급성독성시험, 아급성독성시험 및 만성독성시험

가. 시험동물

- 1) 종 및 계통의 선택에 있어서는 수명, 각종 자연발생질환의 발생빈도, 독성이 이미 알려진 물질에 대한 감수성 등을 고려한다.
- 2) 동일 검체에 대하여 급성독성시험, 아급성독성시험 및 만성독성시험을 실시하는 경우에는 동일한 종 및 계통의 동물을 사용하는 것이 바람직하다.

나. 시험방법

1) 급성독성시험

가) 동물 : 2종 이상의 순조로이 발육한 암·수의 동물로 하되, 그중 1종은 설치류, 1종은 비설치류로 한다.

나) 동물수 : 설치류는 암·수 각각에 대하여 1군 5수 이상으로 하고 비설치류는 암수 각각에 대하여 1군 2수 이상으로 한다.

다) 투여경로 : 원칙으로 임상적용 경로를 포함하여 경구 및 비경구 경로로 한다. 임상적용 경로가 특수하여 동물에서의 실시가 불가능한 경우에는 다른 적절한 경로로 한다. 경구투여는 원칙적으로 강제투여로 한다. 이 경우에는 통상 검체투여 전에 일정시간 동물을 절식시킨다.

라) 용량단계 : 암·수 각각에 대하여 50%치사량(LD₅₀) 또는 개략의 치사량을 _____

구하기에 충분한 용량단계의 군수를 설정한다. 독성이 약하여 치사량을 구할 수 없을 경우에는 기술적으로 투여 가능한 최대량을 최고 용량으로 한다.

마) 투여횟수 : 원칙으로 1회로 한다.

바) 관찰기간 : 원칙으로 경구투여시에는 2주간이상, 비경구투여시에는 1주간 이상으로 한다.

사) 검색방법

(1) LD₅₀(설치류) 또는 개략의 치사량(비설치류)을 구한다.

(2) 각 군의 전 예에 대하여 일반상태를 상세히 매일 관찰하고, 체중을 관찰기간 중에 3회 이상 측정한다.

(3) 관찰기간 종료시(또는 사망시)에 각군의 전 예(또는 사망 예)를 부검하여 모든 기관·조직을 육안적으로 관찰하고 필요시에는 병리 조직학적 검사를 한다.

2) 아급성 독성시험

가) 동물 : 1종 이상의 동일주령으로 순조로이 발육한 암·수의 동물로 한다. 일반적으로 소동물로서는 랫트 또는 마우스가 사용된다.

나) 동물수 : 암·수 각각에 대하여 1군 5수 이상으로 한다. 동물에 큰 부담을 주는 특수검사, 중도도살 또는 회복시험을 실시하는 경우에는 그에 소요되는 동물수를 미리 추가한다.

다) 투여경로 : 원칙적으로 임상적용 경로로 투여한다. 경구투여의 경우에는 강제투여 또는 사료 아니면 음수에 혼입하여 자유로이 섭취시키는 방법이 있다.

라) 용량단계 : 암·수 각각에 대하여 3단계 이상의 시험군을 설정하는 것과 함께 별도로 대조군을 둔다. 급성독성시험 또는 예비적인 단기간의 연속투여 시험결과를 참고로 유해반응의 종류와 강도를 명확히 하여 중독량, 최소중독량 및 무독성량(No Observable Adverse Effect Level: NOAEL)을 구할 수 있는 투여량 및 군수로 한다. 또, 중독량은 일부의 동물을 치사 시키거나 또는 확실한 독성변화가 나타나는 양으로 하고, 최소중독량은 어떠한 독성변화가 나타나는 최소량으로 한다. 또한 무독성량(NOAEL)은 어느 동물에서도 독성변화가 나타나지 않는 양으로 한다. 사료 또는 음수에 혼입하여 투여하는 경우에는 사료섭취량 또는 음수량으로부터 검체섭취량을 산출한다.

마) 대조군 : 음성대조를 둔다. 음성대조는 검체투여시에 각종 용매, 유화제 등을 필요로하는 경우에는 그것만을 투여⁴하는 군으로 한다. 또한 기타 무치⁷

대조군을 두는 것이 바람직하다.

바) 투여기간 : 3주간 이상으로 하며 투여는 주 7일로 한다.

사) 검색방법 :

- (1) 각군의 전 예에 대해서 일반상태를 상세히 매일 관찰하고, 체중을 주 2회 이상 측정한다.
- (2) 투여기간중 개별 또는 군마다 사료 및 검체 등의 섭취량을 주 2회이상 측정한다.
- (3) 투여기간중 각군의 전부 또는 일부의 예에 대하여 1회 이상 뇨검사, 안과적 검사를 한다. 또, 검체의 화학구조, 약리작용 및 일반상태로부터 유추하여 적절한 임상검사를 추가하는 것이 바람직하다.
- (4) 투여기간중의 사망예에 대하여는 빨리 부검하여 기관·조직을 육안적으로 관찰하고 필요시에는 병리 조직학적 검사를 한다.
- (5) 투여기간에 중예 죽음이 임박한 예에 대하여는 빨리 도살 부검하여 기관·조직을 육안적으로 관찰하고 필요시에는 병리조직학적 검색을 한다. 또한 도살시에 혈액을 채취하여 혈액학적 검사 및 혈액생화학적검사를 하는 것이 바람직하다.
- (6) 투여종료시의 생존 예에 대하여는 24시간 후에 도살 부검하여 전예에 대하여 기관·조직을 육안적으로 관찰하고 필요시에는 병리조직학적 검사를 한다. 또한 도살시에 혈액을 채취하여 혈액학적 검사 및 혈액생화학적 검사를 한다. 검사항목은 가능한 한 많은 항목에 걸치는 것이 바람직하며, 각 항목의 측정에는 각각 국제적으로 널리 이용되는 방법 및 측정단위를 채용한다. 또한 근육, 지방, 간장, 신장 등에 대하여 검체등의 잔류량을 측정하는 것이 바람직하다.

3)만성독성시험

가) 동물 : 1종 이상의 동일 주령으로 순조로이 발육한 암·수의 동물로 한다. 일반적으로 소동물로서는 랫트 또는 마우스가 사용된다.

나) 동물수 : 암·수 각각에 대하여 1군 10수 이상으로 한다. 동물에 큰 부담을 주는 특수검사, 중도도살 또는 회복시험을 실시하는 경우에는 그에 소요되는 동물수를 미리 추가한다.

다) 투여경로 : 임상적용 경로 또는 경구투여로 한다. 경구투여의 경우에는 사료 아니면 음수에 혼입하여 자유로이 섭취시키는 방법 또는 강제투여에 의한 방법이 있다.

라) 용량단계 : 암·수 각각에 대하여 3단계 이상의 시험군을 설정하는 것과 함께 별도로 대조군을 둔다. 아급성독성시험의 결과를 참고로 어떠한 독성변화가 나타나는 양 및 무독성량(NOAEL)을 구할 수 있는 투여량 및 군수를 결정한다. 시료 또는 음수에 혼입하여 투여하는 경우에는 사료섭취량 또는 음수량으로부터 검체 섭취량을 산출한다.

마) 대조군 : 음성대조를 둔다. 음성대조는 검체투여시에 각종 용매, 유화제 등을 필요로 하는 경우에는 그것만을 투여하는 군으로 한다. 또한 기타 무처리 대조군을 두는 것이 바람직하다.

바) 투여기간 : 3개월 이상으로 하며 투여는 주 7일로 한다.

사) 검색방법 :

(1) 각군의 전 예에 대하여 일반상태를 상세히 매일 관찰하고, 체중을 투여 개시 후 1개월까지는 주 2회이상, 그 후 2개월간은 주 1회이상, 그 후는 4주에 1회이상 측정한다.

(2) 투여기간중 개별 또는 군마다 사료 및 검체등의 섭취량을 투여개시후 1개월까지는 주 2회이상, 그후 2개월간은 주 1회이상, 그 후는 4주에 1회이상 측정한다.

(3) 투여기간중 각군의 전부 또는 일부의 예에 대하여 1회이상 뇨검사, 안과적 검사를 한다. 또 필요하면 기타 임상검사를 실시한다.

(4) 투여기간중의 사망예에 대하여는 빨리 부검하여 기관·조직의 육안적 관찰, 중량측정 및 병리조직학적 검사의 대상으로 되는 기관·조직은 다음과 같으나 육안소견등으로부터 그 필요성이 인정되지 않는다고 판단되는 경우에는 그의 일부를 생략할 수 있다. [피부, 유선, 임파절, 타액선, 흉골, 대퇴골(골수 포함), 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, 뇌*, 하수체*, 척수, 안구, 부누선(Harder's gland), 기타 육안으로 변화가 인정된 기관·조직] 상기의 기관·조직중 *를 붙인 것에 대해서는 그 중량을 측정한다.

(5) 투여기간 중에 죽음이 임박한 예에 대하여는 빨리 도살부검하여 (4)와 같이 기관·조직의 육안적관찰, 중량측정 및 병리조직학적 검사를 한다. 또한, 도살시에 혈액을 채취하여 혈액검사 및 혈액생화학적 검사를 하는 것이 바람직하다.

(6) 투여종료시의 생존 예에 대하여는 도살⁶ 부검하여 (4)와 같이 각군의 전^가예

에 대하여 기관·조직의 육안적 관찰 및 중량을 측정한다. 병리조직학적 검사는 원칙으로 대조군 및 최고용량군의 전 예에 대하여 실시하나 다른 시험군에서 육안적으로 변화가 인정된 기관·조직이 있는 경우 또는 최고 용량군에서 관찰된 변화로부터 고찰할 필요가 있는 경우에는 다른 시험군의 전 예에 대하여서도 당해 기관·조직의 병리조직학적 검사를 한다. 검사항목은 가능한 많은 항목에 걸치는 것이 바람직하며, 각 항목의 측정에는 각각 국제적으로 널리 이용되는 방법 및 측정단위를 채용한다.

2. 생식독성시험

원칙으로 신 동물용의약품에 대하여 『1)최기형성시험』을 실시한다. 본 시험의 성격에 따라 필요하다고 생각되는 경우 또는 따로 알려져 있는 지식으로부터 암·수 동물에 생산능력이라든가 분만 등 생식과정에 대하여 영향을 미치는 것이 의심되는 동물용의약품에 대하여는 『2) 1세대 생식독성시험』을 실시한다. 임신전부터 이유기까지에 걸친 생식과정을 3구분하여 각각을 투여기간으로하여 『1)임신전 및 임신초기 투여시험』 및 『3)주산기 및 수유기 투여시험』을 실시하며 생식발생에의 악영향을 정확하게 파악할 수 있도록 배려한 시험법을 채용하여도 지장이 없다.

가. 시험동물

- 1) 종 및 계통의 선택에 있어서는 수태능력 등의 생식에 관한 지식, 자연발생 기형의 발생빈도, 생식·발생에 악영향을 미치는 것이 확실히 알려져 있는 물질에 대한 감수성 등을 고려한다.
- 2) 기형 새끼의 자연발현율이 낮은 종 및 계통을 선택하는 것이 바람직하다.
- 3) 최기형성시험 및 1세대 생식독성 시험에 공통으로 사용되는 동물은 종 및 계통이 동일한 것이 바람직하다.

나. 시험방법

1) 최기형성시험

가) 동물 : 랫트 또는 마우스 등의 설치류 및 토끼 등의 비설치류에서 각각 선택한 각 1종 이상의 암·수으로 한다. 일반적으로는 시험이 비교적 용이하고 일반적인 대사 양식 등이 비교적 알려져 있는 동물종이 사용된다.

나) 동물수 : 랫트 또는 마우스에서는 1군 20수 이상, 토끼에서는 1군 8수 이상으로 한다. 동물수는 임신이 이루어진 개체의 수를 의미한다. 랫트, 마우스 또는 토끼 이외의 동물 종을 사용하는 경우에는 원칙으로 적정한 평가가 기대되는 동물수로 한다.

다) 투여경로 : 원칙으로 임상적용 경로로 한다. 경구투여의 경우에는 강제투여를 원칙으로 한다. 강제투여법은 확실하게 일정량을 투여할 수 있다는 점 등에서 사료 아니면 음수에 혼입하여 자유로이 섭취시키는 방법보다 낫다. 임상적용 경로를 채용하기 어려운 경우에는 다른 경로로 대신하여도 좋다.

라) 용량단계 : 3단계 이상의 시험군을 설정하는 것과 함께 별도로 대조군을 둔다. 최고용량은 사료섭취량의 저하, 체중 증가의 억제 등 어떠한 뚜렷한 독성 징후가 나타나는 최소량으로 한다. 기술적으로 투여 가능한 최대량에서도 독성징후가 나타나지 않는 경우에는 그 양을 최고용량으로 한다. 최저용량은 어미와 태자 모두에게 장애가 나타나지 않는 양으로 한다. 중간용량(복수인 것도 있다)은 원칙으로 최고용량과 최저용량의 등비증향으로 한다. 용량단계 중에서는 당해 사용동물에서 약리효과가 나타나는 양 또는 추정임상 상용량과 가까운 용량이 포함되는 것이 바람직하다.

마) 대조군 : 음성대조를 둔다. 또한 필요에 따라서 양성대조 또는 비교대조를 둔다. 음성대조는 검체투여시에 각종 용매, 유화제 등을 필요로 하는 경우에는 원칙적으로 그것만을 투여하는 군으로 한다. 또한 양성 대조에는 최기형성을 갖고 있는 것이 확실히 알려져 있는 물질을, 비교대조에는 화학구조 또는 약효가 유사한 기존약물을 사용한다.

바) 투여기간 : 태자의 기관형성 기간에 매일 투여한다.

사) 검색방법 :

(1) 시험기간 중 어미에 대하여는 각 군의 전 예에 대하여 그의 생사 및 일반상태를 상세히 매일 관찰하고, 체중 및 사료섭취량을 측정한다.

(2) 어미는 전 예를 임신말기에 부검하여 황체수, 착상수 및 흡수수와 태자의 사망 유무를 조사하고 한편 생존태자에 대하여는 성별, 체중등의 측정 및 외형 이상, 골격 및 내부장기의 기형 등 형태학적 검색을 한다. 사망태자에 대하여는 가능한 한 사망 시기를 추정할 근거가 되는 소견을 기록한다. 또한 어미에 대하여는 기관·조직의 육안적 관찰과 필요에 따라 병리조직학적 검사를 한다.

2) 1세대 생식독성시험

가) 동물 : 설치류 등에서 선택한 1종 이상의 암·수 동물로 한다. 일반적으로는 랫트 또는 마우스가 사용된다.

나) 동물수 : 1군 20수 이상의 숫놈과 임신 말기에서 원칙으로 1군 20수 이상의 임신 동물을 확보하기 위하여 필요한 암놈으로 한다.

다) 투여경로 : 원칙으로 임상적용 경로로 한다. 경구투여의 경우에는 강제투여 또는 사료 아니면 음수에 혼입하여 자유로이 섭취시키는 방법이 있다. 임상적용 경로를 채용하기 어려운 경우에는 다른 경로로 대신 하여도 좋다.

라) 용량단계 : 3단계 이상의 시험군을 설정하는 것과 함께 별도로 대조군을 둔다. 최고용량은 사료섭취량의 저하, 체중증가의 억제 등 어떠한 뚜렷한 독성징후가 나타나는 최소량으로 한다. 기술적으로 투여 가능한 최대용량에서도 독성징후가 나타나지 않는 경우에는 그 양을 최고용량으로 한다. 최저용량은 부모동물, 태자 또는 출생새끼의 어느 것에도 장애가 나타나지 않는 양으로 한다. 중간용량(복수인것도 있다)은 원칙적으로 최고용량과 최저용량의 등비중항으로 한다. 용량단계 중에는 당해 사용동물에서 약리효과가 나타나는 양 또는 추정임상상용량과 가까운 용량이 포함되는 것이 바람직하다.

마) 대조군 : 음성대조를 둔다. 또 필요에 따라서 양성대조 또는 비교대조를 둔다. 음성대조는 검체 투여시에 각종용매, 유화제 등을 필요로 하는 경우에는 원칙적으로 그것만을 투여하는 군으로 한다. 또 양성대조에는 생식에 악영향을 미치는 것이 확실히 알려져 있는 물질을, 비교대조에는 화학구조 또는 약효가 유사한 기존약물을 사용한다.

바) 투여기간 : 설치류의 경우 암·수 모두 8주령부터 8주간 이상 매일 투여한 후 교배시킨다. 교배는 3주간을 한도로 하여 동일한 숫놈과 암놈을 1대1로 동거시킨다. 수놈에 대하여는 교배기간중에도 연속투여하고, 암놈에 대하여는 교배기간중, 임신기간중 및 분만후 신생자의 이유까지의 기간에 투여를 계속한다.

사) 검색방법 :

(1) 시험기간중 각 군의 전 예에 대하여 그의 생사 및 일반상태를 상세히 매일 관찰하고, 체중 및 사료섭취량을 측정한다.

(2) 교배기간이 종료한 숫놈은 도살부검하여 기관·조직을 육안적으로 관찰한다. 교미가 성립하지 않은 암·수에 대하여는 그 원인을 조사한다. 교미율 및 수태율을 구한다. 이들은 통상 다음의 산출법에 의한다.

$$\text{교미율} = (\text{교미동물} / \text{동거동물}) \times 100$$

$$\text{수태율} = (\text{수태동물} / \text{교미동물}) \times 100$$

(3) 각군의 전 예를 분만포육 시킨다. 분만시에는 분만의 장애나 지연의 징후 등에 대하여 관찰한다. 어미의 수유·포육본능에 대한영향등을 조사한다. 출산율을 구한다. 이는 통상 다음의 산출법에 의한다.

$$\text{출산율} = (\text{생자출산 암놈수} / \text{임신암놈수}) \times 100$$

(4) 신생자에 대하여는 산자수, 그의 생사, 성별 및 외표에서의 변화등을 검색하고 체중을 측정한다. 동복생자수를 조절하는 경우에는 생후 비교적 빠른 시기에 어미 한 마리당 숫놈과 암놈이 거의 동수가 되도록 일정 마리수를 무작위로 채취하고 여분의 새끼를 도태한다. 랫트 또는 마우스에서는 통상 생후 4일령에서 8마리 정도로 한다.

(5) 출생자에 대하여는 성장 및 발달과 함께 특이한 증상의 유무나 행동의 이상 등에 관하여 검색한다. 출생자에 이상소견이 보인 경우에는 필요에 따라 새로이 유모포육 시험을 실시하여 생후 어느 시기에서의 영향에 의한 것인가를 분석한다. 성장 및 발달에 대하여는 형태, 기능 및 행동에 관하여 검색한다. 또한 필요에 따라서 다시 장기간 관찰한다. 출생으로부터 이유까지의 사이에 출생율, 생존율 및 이유율을 구한다. 이들은 통상 다음의 산출법에 의한다.

$$\text{출생율} = (\text{출산생자수} / \text{착상두수}) \times 100$$

$$\text{4일생존율} = (\text{생후4일생자수} / \text{출산생자수}) \times 100$$

$$\text{이유율} = (\text{이유시생자수} / \text{생후 4일의 생자수 또는 도태직후의 생자수}) \times 100$$

(6) 처치된 어미에 대하여는 적당한 시기에 부검하여 기관·조직을 육안적으로 관찰한다. 또 필요에 따라서 검체의 투여를 계속하여 다세대에 관한 검사를 실시한다.

3. 변이원성시험

원칙으로 신 동물용의약품에 대하여 유전자 돌연변이 유발성을 지표로 하는 『1)세균을 이용하는 복귀변이시험』, 염색체이상 유발성을 지표로 하는 『2)포유류 배양세포를 이용하는 염색체 이상시험』 및 『3) 설치류를 이용하는 소핵시험』을 실시한다. 또 이상의 시험 및 다른 독성시험 결과와 아울러 약리작용에 관한 시험결과로부터 필요하다고 인정되는 경우에는 기타 변이원성 시험을 추가하여 실시하는 것이 바람직하다.

가. 시험방법

1) 세균을 이용하는 복귀변이 시험

가) 균주 : *Salmonella typhimurium* TA 1535, TA 1537, TA 98, TA 100등으로 하고 필요에 따라 다른 균주를 대체 또는 추가할 수 있다. 또한 필요하다고 인정되는 경우에는 대장균(*E.coli*) WP 2 uvr A등의 몇 가지 균주를 추가하는 것이 바람직하다.

나) 용량단계 : 5~6단계의 시험용량을 설정하는 것과 함께 별도로 대조^가를 둔다.

최고용량은 원칙으로 5mg/plate를 한도로 하고 항균성을 나타내는 약물에서는 항균성을 나타내는 최소량으로 한다.

다) 대조 : 음성 및 양성 대조를 둔다. 음성대조는 원칙으로 용매대조로 한다. 양성대조로서는 이미 알려진 변이원성 물질(S9mix를 필요로 하지 않는 물질과 필요로 하는 물질)을 사용한다.

라) 대사활성화 : S9mix를 가한 시험과 가하지 않은 시험을 병행하여 실시한다. 포유류(통상은 랫트)에 적절한 약물대사 효소계의 유도제를 투여한 후 간장으로부터 S9를 제조한다. 이 S9에 보호소 등을 가한 S9mix를 사용한다.

마) 시험방법 : preincubation법 또는 plate법의 어느 것으로 할 수 있으나 일반적으로 preincubation법으로 실시하는 것이 보다 더 바람직하다.

바) 결과 : 복귀변이 colony수의 실측치와 그의 평균치를 표시(그림을 포함)한다. 복귀변이 colony수가 음성대조군의 2배 이상이거나 통계학적으로 유의성을 나타낼 때 양성으로 판정한다.

2) 포유류 배양세포를 이용하는 염색체이상 시험

가) 세포 : 포유류의 초대 또는 계대배양 세포를 사용한다. Chinese hamster 섬유아세포(CHL, CHO)등 가능한 한 감수성이 높은 것을 사용하는 것이 바람직하다.

나) 용량단계 : 3단계 이상의 시험용량을 설정한다. 최고용량은 세포증식(또는 분열)이 50% 억제되는 농도를 지표로 하여 그 전·후의 용량을 사용한다. 세포독성이 인정되지 않는 경우는 10mM상당 또는 5mg/ml 농도를 한도로 한다.

다) 대조 : 음성 및 양성대조를 둔다. 음성대조는 원칙으로 용매대조로 한다. 양성대조로서는 이미 알려진 염색체 이상 유발물질을 사용한다.

라) 대사활성화 : 적절한 대사활성화 방법을 병용하는 것이 바람직하다. 포유류(통상은 랫트)에 적절한 약물대사효소계의 유도제를 투여한 후 간장으로부터 S9를 제조한다. 이 S9에 보호소등을 가한 S9mix를 사용한다.

마) 검색방법 : 검체 처리후 적절한 시기에 염색체 표본을 만든다. 농도당 100개의 분열중기상에 대하여 염색체의 형태이상 및 배수성 세포에 대하여 검색한다. 형태 이상에서는 염색분체 또는 염색체에서 보이는 구조 이상의 종류를 명기한다.

바) 결과 : 염색체 이상을 지닌 세포와 출현빈도 또는 세포당 염색체 이상빈도를 표시(그림을 포함)한다. 염색체이상의 수가 통계학적으로 유의성있게 용량의존적으로 증가하거나, 하나 이상의 용량¹¹단계에서 재현성있게 양성반응을 나타내

는 경우 양성으로 판정한다.

3) 설치류를 이용하는 소핵시험

가) 동물 : 원칙으로 순계 또는 균일계의 숫놈을 사용한다. 일반적으로는 마우스가 사용된다.

나) 동물수 : 1군 5수 이상으로 한다.

다) 투여경로 : 복강내, 임상적용경로 또는 경구투여로 한다. 경구투여는 원칙적으로 강제투여로 한다.

라) 용량단계 : 3단계 이상의 시험군을 설정한다. 최고용량은 체중증가의 억제 등 어떠한 독성징후가 나타나는 최소량(대체로 LD₅₀의 1/2)으로 한다.

마) 대조군 : 음성 및 양성대조를 둔다. 음성대조는 원칙으로 용매대조로 한다. 양성대조로서는 이미 알려진 소핵유발물질을 사용한다.

바) 투여횟수 : 1회 투여를 원칙으로하며 필요에 따라 24시간 간격으로 2~5회 연속투여한다. 단, 연속투여하는 경우에는 적절한 단일용량을 설정한다. 투여용량의 선정이유를 명기한다.

사) 검색방법:

(1) 검체 투여후 적절한 시기에 각군의 전 예를 도살하여 골수도말 표본을 만든다. 표본제작은 일반적으로 검체투여후 18~72시간째에 하는 것이 바람직하다.

(2) 원칙으로 개체당 1,000개의 다염성적혈구에 대하여 소핵의 유무를 검색한다. 동시에 전 적혈구에 대한 다염성 적혈구의 출현빈도를 구한다. 다염성 적혈구 대신에 망상적혈구의 빈도를 구하여도 좋다.

마) 결과 : 소핵을 갖는 다염성 적혈구에 대한 다염성 적혈구의 출현빈도 및 전 적혈구에 대한 다염성 적혈구의 출현빈도를 표시한다. 양성결과가 얻어진 경우에는 용량 의존성 대하여 그림으로 나타낸다. 소핵을 가진 다염성 적혈구의 수가 통계학적으로 유의성있게 용량 의존적으로 증가하거나, 하나 이상의 용량단계에서 재현성있게 양성반응을 나타내는 경우 양성으로 판정한다.

4. 암원성 시험

원칙으로 다음의 어느것에 의해 암원성이 의심되는 경우에는 암원성 시험을 실시한다.

가) 화학구조 또는 약리작용

나) 독성시험의 결과

다) 기타

가. 시험동물

가) 종 및 계통의 선택에 있어서는 감염성 질환에 대한 저항성, 수명, 자연발생 종양의 발생빈도, 이미 알려진 암원성물질에 대한 감수성 등을 고려한다.

나) 동일검체에 대하여 암원성 예비시험 및 암원성 시험을 실시하는 경우에는 동일한 종 및 계통의 동물을 사용한다.

나. 시험방법

가) 동물 : 2종 이상의 암·수 동물로 한다. 또 동일주령으로 순조로이 발육한 6주령까지의 동물을 사용하는 것이 바람직하다. 일반적으로는 랫트, 마우스 또는 햄스터가 사용된다. 이유후 가능한 한 빠른 시기에 개시하는 것이 바람직하다.

나) 동물수 : 암·수 각각에 대하여 1군 50수 이상으로 한다. 각 군에의 동물의 배치에는 체중층별 등에 의한 적절한 무작위 추출법을 사용한다.

다) 투여경로 : 원칙으로 임상적용 경로로 한다. 경구투여의 경우에는 강제투여 또는 사료 아니면 음수에 혼입하여 자유로이 섭취시키는 방법이 있다. 검체를 사료에 혼입하여 투여하는 경우에는 검체농도는 최고 5%까지로 한다.

라) 용량단계 : 암·수 각각에 대하여 3단계 이상의 시험군을 설정하는 것과 함께 별도로 대조군을 둔다. 고용량은 독성증상을 나타내는 양으로서 동물이 장기 생존 가능하다고 생각되는 최대량으로 하고, 최저용량은 원칙으로 당해 사용 동물에서 약리효과가 나타나는 양 또는 추정임상용량을 감안하여 설정한다. 중간용량은 최고용량과 최저용량과의 등비중항을 취하는 것이 바람직하다. 일반적으로는 최저용량은 최고용량의 10%이상인 것이 바람직하다. 단, 최저용량과 추정임상용량이 현저하게 떨어져 있는 경우에는 최고 용량의 10% 미만의 용량을 별도로 설정하여도 좋다. 검체를 사료 또는 음수에 혼입하여 투여하는 경우에는 투여기간중 개별 또는 군마다 사료섭취량 또는 음수량을 투여개시후 1개월까지는 주 2회 이상, 그후 2개월간은 주 1회 이상, 그 후는 4주에 1회 이상 측정하여 검체섭취량을 산출한다. 또 시험 개시전 및 시험중에 필요에 따라 검체의 순도, 안정성 및 불순물을 가능한 한 정성적 또는 정량적으로 분석한다.

마) 대조군 : 음성대조를 둔다. 음성대조는 검체투여시에 각종용매, 유화제등을 필요로 하는 경우에는 그것만을 투여하는 군으로 한다. 또한 기타 무처리 대조군을 두는 것이 바람직하다.

바) 투여기간 : 랫트에서는 24개월이상 30개월이내, 마우스 및 햄스터에서는 18개월 이상 24개월 이내로 하고, 투여는 원칙으로 주 7일로 한다. 강제투여의 경우 실무적인 견지에서 주 5일 이상의 투여도 용인된다.

사) 시험기간 : 투여종료시 또는 투여종료 후 1~3개월 까지로 한다. 단, 시험의 최장기간은 랫트에서는 30개월, 마우스 및 햄스터에서는 24개월로 하고 최저용량군 또는 대조군의 누적 사망률이 75%가 되는 경우에는 그 시점에서 생존 예를 도살하여 시험을 종료한다. 종양 이외의 원인에 의한 사망률이 투여개시 후 랫트에서는 24개월, 마우스 및 햄스터에서는 18개월의 시점에서 50% 이내일 것이 요구된다. 어떠한 군에서도 동물의 10% 이상이 자기용해, 서로 잡아먹기 또는 사육상의 문제로 없어지지 않을 것이 요구된다. 따라서 시험기간중에 쇠약동물이나 죽음이 임박한 동물이 발견되는 경우에는 격리 또는 도살해부 등의 배려가 필요하다.

아) 검색방법

(1) 각 군의 전 예에 대하여 일반상태를 상세히 매일 관찰하고 체중을 투여개시 후 1개월까지는 주 2회이상, 그후 2개월간은 주 1회이상, 그 후는 4주에 1회이상 측정한다.

(2) 시험기간중의 사망 예에 대하여는 빨리 부검하여 기관·조직의 육안적 관찰 및 병리조직학적 검사를 실시한다. 병리조직학적 검사는 다음의 기관·조직에 대하여 실시한다. [피부유선, 임파절, 타액선, 흉골, 추골 또는 대퇴골(골수를 포함), 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 육안으로 종양성 병변이 인정된 기관·조직] 종양성 병변의 기재시에는 종양발생에 이르는 각종변화(전암병변)의 소견도 부가할 필요가 있다.

(3) 시험기간중에 죽음이 임박한 예에 대하여는 빨리 격리 또는 도살부검하여 (2)와 같이 기관·조직의 육안적 관찰 및 병리조직학적 검색을 한다. 또 도살시 필요에 따라 혈액을 채취하여 말초혈액의 적혈구 수 및 백혈구 수를 측정하는 것과 함께 도말표본을 만들어 빈혈, 임파절, 간장, 비장의 총대 등 혈액질환을 예상시키는 예에 대하여는 도말표본을 검사한다.

(4) 시험 종료시의 생존 예에 대하여는 빨리 부검하여 각 군의 전 예에 대하여 (2)와 같이 기관·조직을 육안적으로 관찰한다. 병리조직학적 검색은 원칙으로 시험군 및 대조군에 대하여 실시한다.¹⁴ 또 도살시 필요에 따라 혈액을^가채

취하여 말초혈액의 적혈구 수 및 백혈구 수를 측정하는 것과 함께 도말표본을 만들어 빈혈, 임파절, 간장, 비장의 종대 등 혈액 질환을 예상시키는 예에 대하여는 도말표본을 검사한다.

5. 미생물학적 독성시험

원칙으로 다음의 것에 모두 해당되는 경우에는 시험관내 또는 생체내에서 미생물학적 독성을 지표로 하는 1) 장점막 균집락 방어벽교란성시험, 2) 내성유발성시험 또는 3) 대사능 이상시험을 실시한다. 공시물질의 항균작용의 특징 등에 따라 시험해야할 미생물학적 독성지표를 결정할 수 있으며 관련된 정보가 없는 경우 원칙적으로 장점막 방어벽 교란성 시험과 내성유발성 시험 및 대사능 이상시험을 실시한다.

가) 미생물학적으로 효과가 있는 동물용의약품: 당해 동물용의약품의 잔류물질 및(또는) 이의 대사물질이 인체장내정상세균총에 대하여 미생물학적으로 활성을 띠는 것, 또는 이와 관련된 자료가 없는 것

나) 인체 결장으로 유입되는 동물용의약품: 당해 동물용의약품의 잔류물질이 인체 결장으로 유입되는 것 또는 이와 관련된 자료가 없는 것

다) 인체 결장중으로 유입되어 미생물학적으로 효과를 발휘하는 동물용의약품: 당해 동물용의약품의 잔류물질이 인체 결장으로 유입되어 미생물학적으로 활성을 띠는 것 또는 이와 관련된 자료가 없는 것

가. 시험방법

1) 장점막 방어벽 교란성 시험

인체장내정상세균총의 균조성 변화는 장점막 균집락 방어벽 교란성의 간접적 지표이며 좀 더 직접적으로 병원균의 공격에 의한 장점막 균집락의 파괴 또는 장내정상세균총의 과도증식도 지표가 될 수 있다. 이러한 경우 공격접종 세균은 시험물질에 대하여 감수성이 없어야 한다. 약물인체장내정상세균총 발현마우스와 같은 생체내 시스템 또는 혐기성 유속배양 시스템과 같은 복합적인 시험관내 시스템은 장점막 균집락 방어벽 교란성에 대한 신뢰성 높은 평가결과를 제공한다. 시험관내 시험으로서 간이 최소억제농도시험, 혐기성 유속배양 시스템 이용 시험 등이 있으며 생체내 시험으로서 인체장내정상세균총 발현마우스 이용시험이 있다.

가) 간이 최소억제농도 시험

① 균 주

원칙으로 최소 3개월 이상 항생·항균제에 노출된 바가 없으며 정상적인 배변

활동을 하는 3인이상의 건강한 성인으로부터 무균 및 혐기적으로 채취한 분변에서 분리한 주요 장내정상세균총 10종 이상을 사용한다. 주요 장내정상세균총으로는 *Bacteroides fragilis*, 기타 *Bacteroides* spp., *Fusobacterium* spp., *Bifidobacterium* spp., *Eubacterium* spp., *Clostridium* spp., *Peptococcus* 및 *Peptostreptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Escherichia coli* 등이 있다. 각각의 장내 주요정상세균총 종별로 10주이상을 사용하는 것을 원칙으로 한다.

② 용량단계

공비를 2로하여 균종별 선택 액상배지로 희석하며 이때의 최고용량은 512 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 하여 최소억제농도를 구할 수 있는 용량단계를 둔다.

③ 시험방법

각 장내 주요 정상세균별로 10주이상을 분리 배양한 후 Mcfalan 계수를 기준으로 배양액중 균수를 1×10^5 및 1×10^9 CFU/ml로 조정하여 평판에 분주하여 각 농도의 시험물질과 혼합하여 배양한 후 각 균별 최소억제농도 기하 평균을 산출한다.

나) 혐기성 유속배양 시스템 이용 시험관내 시험

① 시스템

완전 혐기상태(질소 85%, 수소 10%, 이산화탄소 5%)와 무균상태를 유지하면서 pH 및 온도는 인체 대장과 유사한 상태 (pH 6.5 ± 0.1 , 37°C)로 한다. 배양액을 일정한 속도(35ml/시간)으로 지속적으로 공급하여 일정량의 배양액이 유지되도록 한다.

② 인체분변 접종

원칙으로 최소 3개월 이상 항생·항균제에 노출된 바가 없으며 정상적인 배변활동을 하는 3인이상의 건강한 성인으로부터 무균 및 혐기적으로 채취한 분변을 혐기성 유속배양 시스템이 안정화된 후 배양액의 2%가 되도록 격일로 3회 접종하여 인체장내정상세균총이 안정화 되도록 지속적으로 배양한다. 일반적으로 분변 1차 접종후 16~25일째에 안정화 된다.

③ 용량단계

시험물질의 인체장내정상세균총 최소억제농도 등을 고려하여 무처치군을 포함하여 3용량 이상의 용량군을 둔다.

④ 시험방법

혐기성 유속배양시스템이 안정화 된 후¹⁶ 약물을 지속적으로 10일 이상 접종

하고 약물접종 전후에 정기적으로 배양액을 무균 및 혐기상태를 유지하면서 채취하여 배양액중 인체장내정상세균총의 균종별 균수의 변화를 조사한다. 이때 총 혐기성 및 호기성 균과 약물에 민감한 균종이 포함되도록 한다. 유의하게 균조성의 변화를 유발하는 최저독성량에 대한 10% 신뢰구간의 하한치를 미생물학적 무독성량(No-Observable Adverse Effect Concentration, NOAEC)으로 한다.

다) 생체내 시험

① 실험동물

인체장내정상세균총을 발현하는 실험동물 또는 일반 SPF 실험동물을 사용한다. 성숙한 수컷동물을 사용하는 것이 바람직하다. 동물수는 각 용량군별 3수이상이상으로 한다.

② 투여경로

경구투여를 하며 강제투여, 음수 또는 사료에 혼입하여 투여한다.

③ 용량단계

무처치군 또는 용매투여군을 대조군으로 하며 대조군을 포함하여 3용량단계 이상으로 한다

④ 투여횟수 및 기간

인체장내정상세균총을 발현하는 실험동물의 경우 인체장내정상세균총이 안정되게 정착한 이후 매일 2주이상 투여한다. 강제경구투여의 경우 원칙으로 1일 1회투여한다. 인체장내정상세균총을 발현하는 실험동물에서 인체장내정상세균총이 안정되게 정착하는데는 분변접종후 약 15~20일이 소요된다.

⑤ 시험방법

약물투여 전후에 일정시간 간격으로 무균 및 혐기상태를 유지하면서 분변을 채취하여 배양액중 인체장내정상세균총의 균종별 균수의 변화를 조사한다. 이때 총 혐기성 및 호기성 균과 약물에 민감한 균종이 포함되도록 한다. 유의하게 균조성의 변화를 유발하는 최저독성량에 대한 10% 신뢰구간의 하한치를 미생물학적 무독성량(No-Observable Adverse Effect Level, NOAEL)으로 한다.

2) 내성유발성 시험

약물예의 노출에 의해 인체장내정상세균총이 내성을 획득하는지 여부를 검사하는 시험으로 시험관내 혐기성유속배양시스템 이용시험 및 생체내 시험이 있다.

① 시스템

완전 혐기상태(질소 85%, 수소 10%, 이산화탄소 5%)와 무균상태를 유지하면서 pH 및 온도는 인체 대장과 유사한 상태 (pH 6.5 ± 0.1 , 37°C)로 한다. 배양액을 일정한 속도(35ml/시간)으로 지속적으로 공급하여 일정량의 배양액이 유지되도록 한다.

② 인체분변 접종

원칙으로 최소 3개월 이상 항생·항균제에 노출된 바가 없으며 정상적인 배변활동을 하는 3인이상의 건강한 성인으로부터 무균 및 혐기적으로 채취한 분변을 혐기성 유속배양 시스템이 안정화된 후 배양액의 2%가 되도록 격일로 3회 접종하여 인체장내정상세균총이 안정화 되도록 지속적으로 배양한다. 일반적으로 분변 1차 접종후 16~25일째에 안정화 된다.

③ 용량단계

시험물질의 인체장내정상세균총 최소억제농도 등을 고려하여 무처치군을 포함하여 3용량 이상의 용량군을 둔다.

④ 시험방법

혐기성 유속배양시스템이 안정화 된 후 약물을 지속적으로 10일 이상 접종하고 약물접종 전후에 정기적으로 배양액을 무균 및 혐기상태를 유지하면서 채취한다. 각 용량별로 채취한 배양액에서 인체장내정상세균총을 평판배지에서 분리·동정한다. 분리·동정한 균을 최소농도억제농도 수준의 약물이 혼입된 평판에 접종한 후 무처치군에 비하여 내성균의 발현율을 조사한다. 유의하게 내성을 발현하는 최저독성량의 10% 신뢰구간의 하한치를 미생물학적 무독성량(No-Observable Adverse Effect Concentration, NOAEC)으로 한다.

다) 생체내 시험

① 실험동물

인체장내정상세균총을 발현하는 실험동물 또는 일반 SPF 실험동물을 사용한다. 성숙한 수컷동물을 사용하는 것이 바람직하다. 동물수는 각 용량군별 3수이상으로 한다.

② 투여경로

경구투여를 하며 강제투여, 음수 또는 사료에 혼입하여 투여한다.

③ 용량단계

무처치군 또는 용매투여군을 대조군으로¹⁸ 하며 대조군을 포함하여 3용량²¹

계이상으로 한다

④ 투여횟수 및 기간

인체장내정상세균총을 발현하는 실험동물의 경우 인체장내정상세균총이 안정되게 정착한 이후 매일 2주이상 투여한다. 강제경구투여의 경우 원칙으로 1일 1회 투여한다. 인체장내정상세균총을 발현하는 실험동물에서 인체장내정상세균총이 안정되게 정착하는데는 분변접종후 약 15~20일이 소요된다.

⑤ 시험방법

약물투여 전후에 일정시간 간격으로 무균 및 혐기상태를 유지하면서 각 용량단계별로 분변을 채취하여 인체장내정상세균총을 평판배지에서 분리·동정한다. 분리·동정한 균을 최소억제농도 수준의 약물이 혼입된 평판에 접종한 후 무처치균을 대조로 하여 내성균의 발현율을 조사한다. 유의하게 내성을 발현하는 최저독성량의 10% 신뢰구간의 하한치를 미생물학적 무독성량(No-Observable Adverse Effect Level, NOAEL)으로 한다.

3) 대사능 이상시험

약물예의 노출에 의해 인체장내정상세균총의 대사능에 영향을 미치는지 여부를 검사하는 시험으로 시험관내 혐기성유속배양시스템 이용시험 및 생체내 시험이 있다.

가) 혐기성 유속배양 시스템 이용 시험

① 시스템

완전 혐기상태(질소 85%, 수소 10%, 이산화탄소 5%)와 무균상태를 유지하면서 pH 및 온도는 인체 대장과 유사한 상태 (pH 6.5±0.1, 37℃)로 한다. 배양액을 일정한 속도(35ml/시간)으로 지속적으로 공급하여 일정량의 배양액이 유지되도록 한다.

② 인체분변 접종

원칙으로 최소 3개월 이상 항생·항균제에 노출된 바가 없으며 정상적인 배변활동을 하는 3인이상의 건강한 성인으로부터 무균 및 혐기적으로 채취한 분변을 혐기성 유속배양 시스템이 안정화된 후 배양액의 2%가 되도록 격일로 3회 접종하여 인체장내정상세균총이 안정화 되도록 지속적으로 배양한다. 일반적으로 분변 1차 접종후 16~25일째에 안정화 된다.

③ 용량단계

시험물질의 인체장내정상세균총 최소억제농도 등을 고려하여 무처치균을 ¹⁹ ₂₁ 포

함하여 3용량 이상의 용량군을 둔다.

④ 시험방법

혐기성 유속배양시스템이 안정화 된 후 약물을 지속적으로 10일 이상 접종하고 약물접종 전후에 정기적으로 배양액을 무균 및 혐기상태를 유지하면서 채취한다. 각 용량별로 채취한 배양액에서 단쇄지방산 (short-chain fatty acids)의 함량, 배양균중 세포지방산 (cellular fatty acids) 및 배양액중 환원효소(nitrioreductase, nitrate reductase, azoreductase 등) 또는 가수분해효소(β -glucuronidase, β -glucosidase 등)의 활성화도 변화를 조사한다. 유의하게 대사능 이상이 관찰되는 최저독성량의 10% 신뢰구간의 하한치를 미생물학적 무독성량(No-Observable Adverse Effect Concentration, NOAEC)으로 한다.

나) 생체내 시험

① 실험동물

인체장내정상세균총을 발현하는 실험동물 또는 일반 SPF 실험동물을 사용한다. 성숙한 수컷동물을 사용하는 것이 바람직하다. 동물수는 각 용량군별 3수이상으로 한다.

② 투여경로

경구투여를 하며 강제투여, 음수 또는 사료에 혼입하여 투여한다.

③ 용량단계

무처치군 또는 용매투여군을 대조군으로 하며 대조군을 포함하여 3용량단계 이상으로 한다

④ 투여횟수 및 기간

인체장내정상세균총을 발현하는 실험동물의 경우 인체장내정상세균총이 안정되게 정착한 이후 매일 2주이상 투여한다. 강제경구투여의 경우 원칙으로 1일 1회 투여한다. 인체장내정상세균총을 발현하는 실험동물에서 인체장내정상세균총이 안정되게 정착하는데는 분변접종후 약 15~20일이 소요된다.

⑤ 시험방법

약물투여 전후에 일정시간 간격으로 무균 및 혐기상태를 유지하면서 각 용량단계별로 분변을 채취하여 분변중 단쇄지방산 (short-chain fatty acids)의 함량, 분변중 인체장내정상세균총의 세포지방산 (cellular fatty acids) 및 분변중 환원효소(nitrioreductase, nitrate reductase, azoreductase 등) 또는 가수분해효소(β -glucuronidase, β -glucosidase 등)의 활성화도 변화를 조사한다

다. 유의하게 대사능 이상이 관찰되는 최저독성량의 10% 신뢰구간의 하한치를 미생물학적 무독성량(No-Observable Adverse Effect Level, NOAEL)으로 한다.

나. 미생물학적 일일섭취허용량 산출

1) 간이 최소억제농도 시험으로부터 산출

공시한 인체장내정상세균총중 시험물질에 대하여 가장 민감한 균의 최소억제농도의 기하평균으로부터 다음과 같이 일일섭취허용량을 산출한다.

$$\text{일일섭취허용량} = \frac{\text{최소억제농도}(\mu\text{g/ml}) \times \text{결장중 장내용물 중량}(220\text{g/일})}{(\mu\text{g/kg 체중}) \times \text{섭취량중 장내정상세균총에 작용하는양 비율} \times \text{성인평균체중}(60 \text{ kg})}$$

2) 혐기성 유속배양 시스템 이용시험 등 시험관내 시험으로부터 산출

각 시험법에서 가장 민감한 미생물학적 독성지표의 무독성량(NOAEC)으로부터 일일섭취허용량을 다음과 같이 산출한다. 시험관내 시험에서는 일반적으로 안전계수의 산입이 필요하지는 않으나 시험성적이 질적·양적으로 불충분할 경우 고려할 수 있다.

$$\text{일일섭취허용량} = \frac{\text{무독성량}(\mu\text{g/ml}) \times \text{결장중 장내용물 중량}(220\text{g/일})}{(\mu\text{g/kg 체중}) \times \text{섭취량중 장내정상세균총에 작용하는양 비율} \times \text{성인평균체중}(60 \text{ kg})}$$

3) 생체내 시험으로부터 산출

각 시험법에서 가장 민감한 미생물학적 독성지표의 무독성량(NOAEL)으로부터 일일섭취허용량을 다음과 같이 산출한다. 생체내 시험에서는 일반적으로 안전계수를 산입하여 일일섭취허용량을 산출한다. 안전계수는 시험물질의 특성, 시험방법, 공시 동물수 등 시험성적의 질적·양적인 타당성을 고려하여 적용한다.

$$\text{일일섭취허용량} = \frac{\frac{\text{무독성량}(\text{mg/kg 체중})}{\text{안전계수}} \times \text{결장중 장내용물 중량}(220\text{g/일})}{(\mu\text{g/kg 체중}) \times \text{섭취량중 장내정상세균총에 작용하는양 비율} \times \text{성인평균체중}(60 \text{ kg})}$$

6. 국소독성시험

원칙적으로 동물용의약품의 특성에 따라 유발적으로 또는 의도적으로 사람 및 동물의 피부 또는 점막에 접촉가능성이 있는 경우 백색토끼를 이용한 피부자극성시험을 실시한다. 또한 접촉가능부위 및 다른 독성시험 결과로부터 필요하다고 인정되는 경우에 안점막자극성시험 등을 추가하여 실시하는 것이 바람직하다.

가. 시험방법

1) 피부자극성 시험

가) 동물 : 원칙적으로 4개월령의 건강한 암컷 백색토끼가 사용된다. 뽀색토끼

가 아닌 다른 동물을 사용할 경우는 합당한 사유가 있어야 한다.

나) 동물수 : 원칙적으로 3마리 이상의 동물을 사용하여야 한다. 단, 부식성이 의심되는 물질의 경우 우선 한 마리의 토끼를 사용하여 시험을 수행하여 피부부식성이 나타나는 경우는 더 이상의 시험을 수행하지 않으며 의심되는 경우는 2마리의 토끼를 이용하여 추가시험을 수행한다.

다) 투여량 : 시험물질이 액상인 경우는 일반적으로 0.5 ml 그리고 고형상이거나 분말인 경우는 0.5g 을 검체로 한다. 이때 고형상인 경우 분쇄하여 증류수 또는 피부에 무해한 적절한 용매에 습윤시켜 균일하게 적용한다.

라) 투여부위 : 약 24시간 전에 미리 등 부위의 털을 깎아 상처가 없는 것을 확인하고, 등 부위의 6cm² 의 비찰과 피부 2개소 및 찰과 피부 2개소로 한다.

마) 투여방법 : 6cm² 의 비찰과 피부 및 찰과 피부 각 1개소에 시험물질을 적용한 후 거즈로 덮고, 테이프로 고정한다. 다음 시험물질의 증발을 막기 위해 침투성 및 반응성이 없는 고형재질의 박지 등으로 덮은 후에 비자극성 테이프를 사용하여 고정한다. 나머지 6cm² 의 비찰과 피부 및 찰과 피부 각 1개소는 대조구획으로 생리식염수나 거즈 등을 동일한 방법으로 적용한다.

바) 투여기간 : 원칙적으로 4시간동안 적용한 후 거즈를 제거한 후 투여부위에 시험물질이 남아 있지 않도록 증류수나 식염수로 가볍게 씻어낸다.

사) 관찰기간: 시험물질을 증류수나 식염수로 세척하여 제거한 후 홍반과 부종의 정도 등 피부반응을 24, 48, 72시간에 관찰하여 찰과 및 비찰과 부위의 피부반응을 대조구획과 비교하여 관찰한다.

아) 검색방법

(1) 개별동물의 찰과 및 비찰과 부위의 피부 반응을 평가 등급표(표1)에 의해 점수화한다. 각 관찰 시기별로 모든 투여동물의 홍반 및 부종 점수를 더해서 그 평균값을 일차피부자극지수로 한다.

(2) 시험물질에 대한 자극성은 가장 높은 일차피부자극지수를 가지고 표2에 의해 구분하여 평가한다. 이때 시험물질의 자극성은 일차피부자극지수 외에도 시험기간 중에 관찰된 임상증상 등을 고려하여 평가하여야 한다.

표 1. 피부반응의 평가 등급표

<홍반과 가피형성>

- 홍반이 전혀 없음

..... 0

- 아주 가벼운 홍반(육안으로 겨우 식별할 정도) 1
- 분명한

홍반..... 2

- 중등도 및 심한 홍반 3

- 심한 홍반(홍당무색의 발적)과 가피형성으로 홍반의 관찰이 어려움... 4

<부종 형성>

- 부종이 전혀 없음..... 0
- 아주 가벼운 부종(육안으로 겨우 식별할 정도)..... 1
- 가벼운 부종(뚜렷하게 부어 올라서 변연부가 분명히 구별될 경우) ... 2
- 보통의 부종(약 1mm정도 부어 올랐을 경우)..... 3
- 심한 부종(1mm 이상 부어오르고 노출부위 밖에까지 확장된 상태) 4

표 2. 피부자극성 판정 지표

일차피부자극지수	분 류
0.0 - 0.5	비자극성
0.6 - 2.0	약한 자극성
2.1 - 5.0	중등도 자극성
5.1 - 8.0	강한 자극성

7. 면역계이상시험

아급성·만성 독성시험 결과 면역반응이상이 의심되거나 생체내에서 항원으로 작용할 수 있는 경우에 면역계에 미치는 영향을 검사하는 시험으로서 이에는 면역독성시험, 항원성시험, 피부감작성시험이 있다. 피부감작성시험의 경우 기니픽을 이용한 피부감작성시험 또는 마우스를 이용한 국소임파절증식성시험 및 기타 피부감작성시험 등을 포함한다.

가. 면역독성시험

가) 시험동물 : 병원체 및 기생충 등 특정병원체 부재(SPF) 마우스 또는 랫드로서

암컷과 수컷 중 시험물질에 대하여 좀 더 예민한 반응이 예상되는 하나의 성을 선택할 수 있다. 암컷을 사용하는 경우에는 임신이 되지 않은 상태이며 출산경험이 없는 동물을 사용한다. 어리고 건강한 동물을 선택하며 체중은 시험개시 시점 평균체중± 20%를 초과하지 않도록 한다. 투여는 6-8주령에 개시한다.

나) 동물수

- ① 시험물질 투여군은 원칙적으로 1군당 10수 이상으로 하며 각 면역독성 지표에 대한 대조군에도 10수 이상의 동물을 사용한다.
- ② 대조군에는 용매대조군, 무처치군, 양성대조군을 둔다. 용매대조군에는 면역독성의 회복성, 지속성 또는 지발성 시험을 추가적으로 시행하는 경우를 대비하여 충분한 수의 동물을 배치한다. 용매의 독성이 불확실한 경우에는 무처치군을 배치한다. 양성대조군에는 최소한 5수 이상을 두며 기히 확인된 면역억제제를 선택하여 면역독성이 확실히 유발되는 용량으로 투여한다.
- ③ 위성군(Satellite group)에는 20수 이상의 시험동물을 배치하며 시험물질 고용량 투여군과 동일 용량으로 하여 30일간 투여한 후 이후 최소 30일간 면역독성의 회복성, 지속성 또는 지발성 등을 관찰한다.

다) 투여경로 : 원칙으로 임상적용 경로를 포함하여 경구 및 비경구 경로로 투여한다. 임상적용 경로가 특수하여 시험동물에서의 실시가 불가능한 경우에는 다른 적절한 경로로 한다. 경구투여의 경우에는 강제투여 또는 사료나 음수에 혼입하여 자유로이 섭취시키는 방법이 있다.

라) 용량설정 : 용량-반응성을 확인하고 무독성량(No observed adverse effect level, NOAEL)을 구할 수 있도록 최소 3단계 이상의 용량 시험군을 두며 이와 함께 별도의 대조군을 둔다. 최고용량은 유의한 수준의 스트레스, 영양결핍 및 치사를 유발하지 않으나 측정 가능한 수준의 일반 독성을 유발하는 양으로 한다. 최저용량은 어떠한 면역독성이 나타나지 않는 양으로 한다.

마) 투여기간 : 최소 30일 이상으로 하며 투여는 주7일로 한다.

바) 관찰기간 : 시험동물의 관찰은 최소 30일 이상으로서 투여기간 내내 이루어진다. 위성군의 경우 투여중지 후 30일간 회복성 또는 지속성 또는 지발성을 관찰한다.

사) 검색방법 :

- (1) 임상증상 검사 : 시험물질 투여기간 동안 각 시험동물에 대하여 최소 1일 1회 이상 관찰하여 특이적인 임상증상이 관찰되면 기록한다. 기록사항으로는 증상발현시기, 증상의 심한 정도 및 지속기간을 포함하며 다음의 항목을 ²⁴주요

관찰대상으로 한다.

- ① 피부 및 피모
- ② 안구 및 점막
- ③ 호흡기계
- ④ 자율신경계 및 중추신경계 관련 이상
- ⑤ 순환계 이상
- ⑥ 운동성
- ⑦ 행동양식
- ⑧ 감염 저항성

(2) 사료 및 음수 섭취량은 매주 확인한다.

(3) 체중 측정은 투여 전, 투여 후 매주 및 시험종료시에 실시한다.

(4) 빈사 상태의 시험동물은 발견 즉시 안락사를 시행하며, 부검은 빈사 상태의 시험동물과 시험기간 중 폐사한 동물 전체에 대하여 시행한다.

(5) 혈액학적, 생화학적 검사 : 다음의 항목은 각 용량군 및 대조군에서 10수에 대하여 검사하며 시험동물은 부검 전날 밤에 절식한다.

① 혈액학적 검사 : 헤마토크리트치, 헤모글로빈 농도, 적혈구수, 총 백혈구수 및 감별 백혈구수, 혈소판수 등을 포함하여 검사한다.

② 혈액화학적 검사 : 혈당, GPT(Serum glutamic-pyruvic transaminase 또는 alanine amino transaminase, ALT), 요소질소, 알부민, 총혈청단백, 면역글로블린, 싸이토카인(IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , MIP-1 β , TNF- α 등) 등을 포함하여 검사한다.

(6) 장기 육안검사 : 부검 직전 체중을 측정하며 장기를 채취하여 중량을 측정한다. 흉선과 비장의 경우 적출 즉시 습윤상태에서 장기중량을 측정하며 기타 장기에 대해서도 건조되지 않도록 주의한다.

(7) 조직병리 검사 : 각 용량시험군 및 대조군 10수에 대하여 조직병리 검사를 수행한다. 육안소견에서 이상이 관찰된 장기에 대하여 조직병리 검사를 실시하며 특이적 및 비특이적 세포매개성 면역반응이상으로 인한 면역계 이상이 관찰되면 흉선, 비장, 간장, 폐장, 신장, 골수(대퇴골, 흉골, 늑골 늑연골 부위 중 선택), 임파절(점막연관 및 변연부), 부신, 송과선, 난소 또는 고환에 대하여 병리조직학적 검사를 실시한다. 조직병리검사대상 장기를 채취하여 조직병리검사가 가능하도록 적정 고정액에 보관한다.

(8) 비장, 흉선 및 골수에서의 세포수(cellularity)²⁵ 및 세포 생존율(cell viability)²⁶가

은 각 용량군 및 대조군에서 최소 10수에서 측정한다.

(9) 면역독성 검사 : 면역독성 검사에는 체액성 면역시험과 특이적 및 비 특이적 세포 매개성 면역시험이 있으며 이들에 대하여 각 1종 이상의 시험을 실시한다. 필요시 추가적인 2단계 면역독성시험을 실시한다.

① 체액성 면역시험 : 시험물질이 체액성 면역반응에 미치는 영향을 평가 하기 위하여 항원 접종후 항체 플라그-형성 세포 검사(Antibody plaque-forming cell assay) 또는 면역글로블린 역가 시험을 실시한다.

(a) 항체 플라그-형성 세포 검사(Antibody plaque-forming cell assay) :

시험물질을 30일간 투여한 후 비장으로부터 채취한 항체형성세포에 대한 시험물질의 영향을 검사한다.

② 시험에 사용하는 시험동물의 종 및 계통에 따라 플라그-형성 세포의 적정 생성시기를 결정한다. 30일간의 시험물질 투여가 비장의 항체 생성세포에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 T세포 의존성 항원인 양적혈구(Sheep red blood cells: SRBC)를 시험물질 투여 개시일로부터 26일째에 정맥내로 투여한다.

③ 새로운 보체가 사용될 때 마다 이의 활성도를 확인한다.

④ 본 시험의 민감도를 검증하기 위하여 기히 알려져 있는 면역억제제 (예, 싸이클로포스파미드 등)를 처치한 양성대조군을 둔다.

⑤ 비장 세포 생존율 및 플라그-형성 세포수를 검사한다.

(b) 면역글로블린 정량검사(Immunoglobulin quantification) :

시험물질을 30일간 투여하면서 시험물질이 항원에 대한 항체의 반응성에 미치는 영향을 평가하기 위하여 시험동물에 적절한 흡선 의존성 항원을 감작시킨 후 적절한 시점에 항원을 2차 접종한다. 시험동물에서 혈청을 채취하여 면역글로블린(IgG 및 IgM) 역가를 검사한다. 면역글로블린 검사는 충분한 빈도로 시행하여 시험군과 대조군에서 1차 및 2차 항체반응성에 대한 비교가 적절히 이루어 질 수 있도록 한다. 최종 면역글로블린(IgG 및 IgM) 역가 측정은 시험물질 투여 30일이 경과한 후에 시행한다.

② 특이 세포 매개성 면역시험 :

시험물질을 30일간 투여한 후 아래의 3종의 시험 중 1종 이상을 선택하여 실시한다.

(a) 일원 혼합 임파구 배양 검사(One-way mixed lymphocyte culture assay, MLC) : _____

30일간 시험물질을 시험동물에 투여한 후 시험동물과 동종이면서 다른 ²⁶가

개체 유래 임파구(allogeneic lymphocytes)에 의해 유도되는 임파구 발생(lymphocyte blastogenesis)을 검사한다. 임파구 발생정도를 알기 위하여 방사선 표지물질(주로 ^3H -thymidine)이 DNA내로 합성되어 표지된 양을 측정하며 검사시 주의할 점은 다음과 같다.

㉑ 차단되지 않은 "반응" 세포(unblocked responder cells)는 대조군 및 시험군 시험동물의 비장으로부터 무균적으로 채취한다.

㉒ "자극유도" 세포(stimulator cells)는 동종의 무처치 시험동물의 비장으로부터 무균적으로 채취하며 마이토마이신 C 또는 X방사선을 처리하여 DNA 합성을 차단한다.

㉓ 반응세포(responder cells)와 자극세포(stimulators)의 생존율을 조사한다.

㉔ 자극세포(stimulator cells)의 반응성이 없음을 확인하거나 무처치 세포의 DNA합성 수준(baseline levels)을 알고 세포채취 기술의 효율성을 확인하기 위하여 3반복 또는 4반복 수준의 시험법 대조군이 필요하다.

㉕ 완전무처치 또는 용매대조군에 대해서도 검사를 실시한다.

㉖ 임파구발생(lymphocytes blastogenesis) 검사 결과는 반응세포(responder cells)와 자극세포(stimulator cells)를 함께 최대 4일간 배양한 후 반응세포(responder cells)에서의 방사선표시 정도를 검사함으로써 얻어진다. 결과는 nCPM 값으로 표시하는데 이는 자극세포와 반응세포의 총 CPM 평균값에서 자극세포가 없이 배양된 세포의 총 CPM 평균값(baseline level)을 뺀 값을 의미한다. 아울러, 시험물질 처치군과 대조군과의 차이 정도는 $\{1 - (\text{처치군의 nCPM} / \text{대조군의 nCPM})\} * 100$ 으로 표시한다.

㉗ 본 검사의 민감도를 확인하기 위하여 적합한 면역억제제를 처치한 양성대조군이 필요하다.

(b) 지발성 과민반응시험(Delayed-type hypersensitivity reaction: DTH) : 일반적으로 시험물질을 30일간 투여하면서 시험동물에 1종의 흡선-의존성 항원을 감작시키고 이후 동일 항원으로 공격접종한다. 공격접종후 24-48시간에 시험군과 대조군에서 지발성 과민반응 정도를 비교한다.

㉘ 면역유발 및 공격접종 물질의 종류, 면역유발물질 접종횟수 및 접종 경로, 공격접종시기 및 동위원소 사용여부²⁷ 등을 결정할 때는 선택한

시험동물에서 DTH 반응이 충분히 양호하게 발현될 수 있는 조건으로 한다. 본 검사는 최소 30일간 시험물질을 투여한 후 실시한다.

(c) Cytotoxic T-림파구 검사(Cytotoxic T-lymphocyte assay; CTL) : Cytotoxic T-림파구를 유도하기 위해 동종의 타개체 유래 종양세포를 사용한다. 처치군 및 대조군에서 비장세포(effector cells)를 채취하여 ⁵¹Cr이 표지된 동종의 타개체 유래 종양세포(target cells)와 함께 배양한다. 4시간동안 효능세포(effector cells)와 표적세포를 함께 배양한 후 표적세포(target cells)로부터 방출된 방사선량은 T-림파구의 세포용해성의 지표가 된다. 본 검사시 주의할 점은 다음과 같다.

- ㉓ 적합한 시험결과를 얻기 위해서는 효능세포(effector cells) 부재시 표적세포(target cells)에서 자발적으로 방출되는 방사선량과 표지 표적세포의 총 방출량을 측정할 수 있는 시험법 대조군이 필요하다.
- ㉔ 시험에 사용되는 시험동물의 cytotoxic T-림파구 생성가능 여부를 확인하고 검사법의 적합성을 확인한다.

③ 비특이적 세포매개성 면역시험 :

시험물질을 30일간 시험동물에 투여한 후 비특이적 세포매개성 면역 반응을 알기위해서 자연살해세포의 활성화도 검사, 대식세포 검사가 있다.

(a) 자연살해세포 활성화도 검사(Natural killer cell activity; NK) :

시험물질을 30일간 투여한후 처치군 및 대조군에서 채취한 비장세포(effector cells)를 ⁵¹Cr이 표식된 YAC-1 임파종 세포(target cells)와 함께 4시간 배양한다. 배양 후 표적세포(target cells)로부터 방출된 방사선량은 자연살해세포 활성화도의 지표이다. 본 검사시 주의할 점은 다음과 같다.

- ㉓ 적합한 시험결과를 얻기 위해서는 효능세포(effector cells) 부재시 표적 세포(target cells)에서 자발적으로 방출되는 방사선량과 방사선 표식 표적세포 총 방출량을 측정할 수 있는 시험법 대조군을 둔다.
- ㉔ YAC-1 임파종 세포 외에 다른 표적세포(target cells)도 사용될 수 있으며, 표적세포의 생존율은 항상 확인한다.

(b) 대식세포(Macrophages) 검사 : 시험물질을 30일간 시험물질에 투여한 후 시험물질이 대식세포의 수와 대식세포의 탐식작용에 미치는 영향을 파악하기 위하여 아래의 검사를 실시한다.

- ㉓ 잔류 복수세포(resident peritoneal cell)²⁸의 총 갯수 및 감별 갯수

- ⑥ 증폭인자(예, 감마 인터페론 또는 세균성 lipopolysaccharide) 유무시 복수 세포(peritoneal cells)에 의한 미세입자(예, 형광 라텍스 비드) 탐식작용성

(10) 2단계 추가 면역독성 시험

- ① 상기 면역독성 검사에서 면역계의 기능이상이나 손상이 확인되는 경우, 정확하게 면역독성 여부를 판정할 수 없는 경우 또는 시험물질 또는 시험물질과 구조상 관련된 물질(대사물질 및 분해산물)이 면역독성물질로서 확인될 경우에는 추가적인 2단계 면역독성시험이 요구될 수 있다.
- ② 상기 면역독성 검사에서 면역계의 기능이상이나 손상이 유발되지 않음이 분명하거나 시험물질 또는 시험물질과 구조상 관련된 물질(대사물질 또는 분해산물)의 면역독성이 유발되지 않음이 입증될 경우 2단계 추가 면역독성시험은 필요하지 않다.
- ③ 2단계 추가 면역독성 시험으로는 면역독성회복성시험, 숙주저항성시험, 기타 면역세포기능성시험 등을 포함한다. 이중 면역독성회복성시험은 상기 면역독성시험에서 조직병리학적 변화를 포함하여 유의한 수준의 면역독성이 관찰될 경우 시험동물 5수 이상이 배치된 위성군 및 대조군에서 시험물질 투여 종료 후 7, 14 및 28일째 경시별 면역독성의 회복성을 평가하는 시험을 말한다. 숙주저항성시험은 *Listeria monocytogenes* 등의 세균이나 PYB6 fibrosarcoma 등의 암세포 또는 Herpes simplex virus type I(HSV-1) 등의 바이러스를 공격접종한 후 숙주저항성을 검색하는 시험을 말하며 기타 면역세포기능성시험은 T 또는 B 림프구 세포의 아군 정량시험 등을 포함한다. 이의 구체적인 시험법은 OECD 지침 등을 참고할 수 있다.

나. 항원성시험

1) 아나필락시스 쇼크 반응시험

가) 동물 : 시험동물은 기니픽을 사용한다.

나) 동물수 : 시험군은 원칙적으로 1군당 5수 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.

다) 투여물질 : 시험물질에 따라 거대분자와의 결합 여부를 결정하여 시험을 실시하며 용매는 0.9%(w/v) 생리식염수를 사용한다. 대조물질로는 시험물질에 따라 항원성이 알려진 저분자 물질, 또는 이²⁹종단백을 사용한다. 가

라) 시험방법

- (1) 투여용량은 추정되는 임상용량 또는 노출량을 근거로 설정한다
- (2) 투여경로는 피하 또는 복강내로 하는 것이 일반적이나, 임상적용경로가 경구인 경우 시험물질만을 경구 또는 피하투여에 의해 감작시키는 경우가 많다. 임상적용경로가 정맥내 투여일 경우에는 피하투여 감작군에서 음성 결과가 얻어지면 임상적용경로에 의한 감작이 필요 없다고 보지만, 양성반응이 의심될 경우에는 그 결과를 보완할 목적으로 투여경로를 임상적용경로로 설정하는 것이 바람직하다.
- (3) 모든 용액은 시험 당일에 조제하며 감작과 야기시 원하는 농도로 준비한다.
- (4) 감작시 대조군에는 0.9%(w/v) 생리식염수를 투여하고, 양성대조군에는 양성대조물질을 투여하여 감작한다. 면역보조제를 사용하지 않는 시험군에는 시험물질을 단독으로 피하, 복강내 또는 임상경로에 준하여 반복투여(주 2-3회, 2-4 주간)하여 감작한다. 면역보조제를 사용하는 시험군은 적당한 면역보조제와 혼합하여 피하, 복강내, 또는 피내에 적절한 간격(1-3주)으로 3회 이상 반복투여하여 감작한다.
- (5) 최종 감작 1-3주 후에 시험물질(야기항원)을 정맥내 투여하여 아나필락시스 쇼크 증상의 발현 유무를 검색한다. 야기항원량은 원칙적으로 감작에 이용한 저용량의 수배로 한다.

마) 결과의 판정

시험결과는 아나필락시스 쇼크 반응시험 판정기준에 따라 판정한다.

표 1. 아나필락시스 쇼크반응 판정기준

1. 불안 (Restlessness)	2 기모 (Piloerection)	3. 기침 (Coughing)	4 과호흡 (Hyperpnea)
5. 배뇨, 배변에 의한 얼룩 관찰 (Urination & evacuation)	6. 유루 (Lacrimation)	7. 호흡곤란 (Dyspnea)	8. 청색증 (Cyanosis)
9. 보행불안 (Staggering gait)	10. 도약 (Jumping)	11. 헐떡거림 (Gaspng)	12. 경련 (Convulsion)
13. 사망 (Death)			

[-] : 무증상, [±] : 1-2의 증상 중 1 이상이 관찰되는 경우,

[+] : 1-2의 증상이 대부분 관찰되면서 3-6의 증상 중 1 이상이 관찰되는 경우,

[++] : 1-6의 증상이 대부분 관찰되면서 7-12의 증상 중 1 이상이 관찰되는 경우,

[+++] Death : 사망

2) 수동 피부 아나필락시스 반응시험

가) 동물 : 이종 수동 피부 아나필락시스 반응시험의 경우 항혈청 제조에 C57BL/6계 마우스 또는 적당한 근교계 마우스를 사용하며, 반응 야기에는 랫드를 사용하고, 동종 수동 피부 아나필락시스 반응시험의 경우 항혈청제조 및 반응 야기에 기니픽을 사용한다.

나) 동물수 : 시험군은 원칙적으로 1군당 5수 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.

다) 용량 및 투여경로 선정 : 용량은 추정되는 임상용량으로부터 선정한다. 투여 경로는 피하, 또는 복강내로 하는 것이 일반적이나, 임상적용 경로로 투여하여도 무방하다.

라) 시험방법

(1) 시험물질에 따라 거대분자와의 결합 여부를 결정하여 시험을 실시하며 용매는 0.9%(w/v) 생리식염수를 사용한다. 대조물질로는 시험물질에 따라 항원성이 알려진 저분자 물질, 또는 이종단백을 사용한다.

(2) 모든 용액은 시험 당일에 조제하며 감각과 야기시 원하는 농도로 준비한다.

(3) 감각시 대조군에는 0.9%(w/v) 생리식염수를 투여하고, 양성대조군에는 양성 대조 물질을 투여하여 감각한다. 면역보조제를 사용하지 않는 시험군에는 시험 물질을 단독으로 피하, 복강내 또는 임상경로에 준하여 반복투여(주 2-3회, 2-4 주간)하여 감각한다. 면역보조제를 사용하는 시험군은 적당한 면역보조제와 혼합하여 피하, 복강내, 또는 피내에 적절한 간격(1-3주)으로 3회 이상 반복투여하여 감각한다.

(4) 최종 감각 1-3주 후에 채혈하여 항혈청을 개체별로 분리한다.

(5) 반응 야기를 위하여 위에서 얻은 개체별 항혈청을 제모한 시험동물의 등부위에 피내주사한다. 항혈청은 적당한 배율까지 연속2배수희석해서 약 0.05-0.1 ml 정도 주사하며 이때 대조군 시험동물의 혈청도 동량 주사한다. 각 혈청당 2-3 수의 시험동물에 주사한다. 감각시킨 시험동물은 사육상자에 넣어 수용하며 24시간 후에 시험물질(야기항원)을 시험동물에 투여한다. 이때 투여할 시험물질 용액은 동량의 1-3%(w/v) Evans blue와 혼합하여 각 시험동물의 정맥내에 투여한다. 야기항원량은 원칙적으로 감각에 이용한 저용량의 수배로 한다.

(6) 야기항원 주사 30분 후에 시험동물 각 개체를 경추탈골 또는 마취하에 치사시켜 등부위 피부를 절취해서 피부안쪽의 청색 반점을 관찰한다.

마) 결과의 판정

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. 피부감작성 시험

1) 피부감작성 시험

가) 동물 : 순조로이 발육한 동일 주령의 기니픽을 사용한다. 암컷을 사용할 경우에는 임신이 되지 않고 출산경험이 없는 동물을 사용한다.

나) 동물수 : 시험군은 각 군당 10수 이상으로 하며 원칙적으로 시험물질군, 용매대조군 및 양성대조군을 둔다.

다) 시험물질

시험물질이 액제 또는 반고형제인 경우 희석하지 않고 사용하고 고형제일 경우 증류수 또는 적절한 용매에 습윤시켜 균일하게 적용한다.

라) 감작 및 야기항원량 결정시험

(1) 피내주사에 의한 감작 항원량의 결정

시험물질을 증류수 또는 적절한 용매로 용해한 후 단계별로 희석하여 제모된 2수이상의 기니픽 등에 0.1ml씩 좌우대칭이 되도록 피내주사 한다. 피내주사 24시간 후에 주사부위를 관찰하여 모든 동물에서 약한 자극성 혹은 중등도 자극성을 나타내는(피부괴사가 나타나지 않는 최고농도)농도를 감작항원량으로 정한다.

(2) 폐색척포에 의한 감작 및 야기 항원량의 결정

시험물질을 증류수 또는 적절한 용매로 용해한 후 단계별로 희석하여 제모된 2수 이상의 기니픽의 측복부에 시험물질 단계별 희석액 0.2ml을 포함하는 패취(1 × 1 cm)를 부착하여 24시간 폐색척포한다. 패취 제거후 24시간 및 48시간째에 관찰하여 약하거나 중등도의 홍반이 나타나는 최저농도를 감작항원량으로 하며, 야기항원량은 홍반(자극)이 나타나지 않는 최대농도를 사용한다.

마) 본시험 방법

(1) 1차 감작은 제모한 시험동물의 등부위 피부(약 2×4cm)의 상부, 중부, 하부에 아래의 용액 0.1ml씩을 좌우 대칭으로 피내주사하며 이중 (가)와 (나)의 주사는 머

리 쪽으로 서로 근접하도록 한다.

(가) 증류수(또는 생리식염수)/Freund's Complete Adjuvant(FCA)의 유화물(1:1 혼합물)

(나) 시험물질 용액 또는 용매대조군의 경우 시험물질을 녹인 용매

(다) 시험물질 용액(또는 시험물질을 녹인 용매)과 증류수(또는 생리식염수)/FCA 유화물(1:1 혼합물)의 혼합액(1:1 혼합물)

(2) 2차 감작은 1차 감작 1주 후 피내주사한 부위를 다시 제모한 뒤 시험물질 (또는 시험물질을 녹인 용매)을 포함하는 패취(2×4cm)를 부착하여 48시간 동안 폐색철폐시킨다. 단, 시험물질이 피부자극성이 없는 경우는 피부자극성을 유도하기 위해 24시간 전에 0.5ml의 10% 라우릴 황산나트륨이 들어 있는 바세린으로 도포한 후에 시험물질을 도포한다.

(3) 야기는 폐색철폐 2주 후 시험동물의 한쪽 등부위 또는 측복부(감작부위와는 다른 부위)를 제모하고 시험물질을 포함하는 패취(2×2cm)를 부착하여 24시간동안 폐색철폐하여 야기시킨다. 또 다른 한쪽에는 용매대조군의 용매를 적용할 수도 있다.

바) 관찰기간 : 폐색철폐 제거후 시험물질을 증류수나 식염수로 세척하고 21시간 째에 제모한 후 24시간 및 48시간째에 피부반응을 평가기준에 의해 기록한다.

사) 검색방법

(1) 폐색철폐 제거 후 24시간 및 48시간에 개체별로 홍반 및 부종 반응을 표1의 피부반응 평가기준표에 의해 점수를 기록하고 투여군별 평균점수를 구한다.

(2) 피부 감작성 평가는 전체 공시동물 중 피부반응이 일어난 개체의 비율 (감작율 %)로 구한다.

(3) 시험기간 중의 피부반응이외에 전신적인 증상을 기록하고 의심되는 반응을 명확히 하기 위해서 병리조직학적 소견 관찰, 피부두께 측정 등을 할 수 있다.

표 1. 피부반응 평가기준

점수	증상
0	무반응
1	홍반이 적용부위에 흩어져 나타남
2	홍반이 적용부위 전체에 나타남
3	전체적으로 강한 홍반 및 부종이 나타남

표 2. 피부감작성 평가기준

감작율(%)	등급	분류
0-8	I	매우약함
9-28	II	약 함
29-64	III	보 통
65-80	IV	강 함
81-100	V	매우강함

2) 마우스를 이용한 국소임파절증식성시험

가) 동물 : 순조로이 발육한 동일 주령의 암컷 CBA 마우스를 사용한다. 이때 암컷은 임신이 되지 않고 출산경험이 없는 동물을 사용한다. 시험시작시기에 동물은 8 내지 12주령사이이고 평균체중의 20%표준편차 범위 이내로 한다.

나) 동물수 : 각 시험물질군은 적어도 4수 이상을 사용한다.

다) 용량단계 : 시험물질군 및 용매대조군을 두며 시험물질군은 3용량 이상으로 한다. 이때, 최대 투여용량은 급성독성 및 피부자극성을 고려하여 체독성이나 과도한 국소자극성이 일어나지 않는 농도이어야 한다. 시험 시 알려진 물질을 양성대조군으로 둘 수도 있다. 단, 시험물질의 용매는 시험물질의 적용을 위해 적절한 용액 또는 현탁액을 만들 수 있는 것으로 아세톤/올리브오일용액(4/1) 또는 시험에 영향을 미치지 않는다고 보고된 용매 등이 권장된다.

라) 시험방법

- (1) 시험기간 동안 공시동물에 대하여 매일 임상증상을 관찰하고 개체별 체중을 기록하는 것을 원칙으로 한다.
- (2) 시험시작 일에 개체별로 각 동물을 확인하고 체중을 기록하고 양쪽 귀의 배부에 시험물질용액 25 μ l을 1회씩 투여한다.
- (3) 시험2, 3일째에도 (1)의 시험절차와 같이 하고 시험4, 5일에는 투여를 중지한다.
- (4) 시험6일째에 각 동물의 체중을 기록하고 20 μ Ci의 3 H-methyl thymidine(또는 2 μ Ci의 125 I-iododeoxyuridine, 10^{-5} M fluorodeoxyuridine)을 포함하는 인산 완충식염수 250 μ l를 미정맥을 통해 주사한다. 주사 후 5시간에 동물을 부검하여 양쪽 귀밑의 이하임파절을 채취하여 시험군별(또는 개체별) 인산완

총식염수에 합친다.

- (5) 합친 이하임파절을 $200\mu\text{m}$ 망에서 물리적으로 갈아 단일 세포 부유액을 만든다. 임파절세포를 인산완충식염수로 2회 세척하고 5% trichloroacetic acid(TCA)로 4°C 에서 18시간 정치하여 침강시킨다. 침강물을 1ml TCA로 부유시켜 1ml의 신틸레이션액이 들어 있는 바이알에 옮겨 β (또는 γ)-방사성 동위원소 측정기로 ^3H (또는 ^{125}I) 양을 DPM(disintegrations per minute)단위로 측정한다. 또는 세포부유액을 형광기질액에 섞어 형광분석기를 이용하여 형광강도를 측정한다.

마) 검색방법

결과는 시험군의 방사성동위원소 표지량(또는 형광강도)을 용매대조군의 방사성동위원소 표지량(또는 형광강도)으로 나눈 값을 자극지수(stimulation index, SI)로 하여 용량반응성 및 통계학적 유의성을 고려하여 SI값이 3이상인 경우 감작성으로 판정한다. 이때 시험물질의 감작성은 SI값 외에도 시험기간 중에 관찰된 임상증상 등을 고려하여 평가하는 것이 바람직하다.

II. 사료첨가제

1. 급성독성시험, 아급성독성시험 및 만성독성시험

가. 시험동물

일반동물용의약품의 시험동물과 같다.

나. 시험방법

1) 급성독성시험

일반 동물용의약품의 급성독성시험에 따른다.

2) 아급성독성시험

가) 동물 : 2종 이상의 동일주령으로 순조로이 발육한 암·수의 동물로 하되, 그중 1종은 설치류, 1종은 비설치류로 한다.

나) 동물수 : 설치류는 암·수 각각에 대하여 1군 10수 이상으로 하고 비설치류는 암·수 각각에 대하여 1군 3수 이상으로 한다. 동물에 큰 부담을 주는 특수검사, 중도도살 또는 회복시험을 실시하는 경우에는 그에 소요되는 동물수를 미리 추가한다.

다) 투여경로 : 원칙으로 임상적용경로로 한다. 경구투여의 경우에는 강제 투여 또는 사료 아니면 음수에 혼입하여 자유로이 섭취시키는 방법이 있다. ³⁵가

라) 용량단계 : 암·수 각각에 대하여 3단계 이상의 시험군을 설정하는 것과 함께 별도로 대조군을 둔다. 급성독성시험 또는 예비적인 단기간의 연속투여 시험결과를 참고로 유해반응의 종류와 강도를 명확히 하여 중독량, 최소중독량 및 무독성량(No Observable Adverse Effect Level : NOAEL)을 구할 수 있는 투여량 및 군수로 한다. 또 중독량은 일부의 동물을 치사 시키거나 또는 확실한 독성변화가 나타나는 양으로 하고, 최소중독량은 어떠한 독성 변화가 나타나는 최소량으로 한다. 또한, 무독성량(NOAEL)은 어느 동물에서도 독성변화가 나타나지 않는 양으로 한다. 사료 또는 음수에 혼입하여 투여하는 경우에는 사료섭취량 또는 음수량으로부터 검체섭취량을 산출한다.

마) 대조군 : 음성대조를 둔다. 음성대조는 검체투여시에 각종 용매, 유화제등을 필요로 하는 경우에는 그것만을 투여하는 군으로 한다. 또한 기타 무처리 대조군을 두는 것이 바람직하다.

바) 투여기간 : 설치류는 3개월 이상, 비설치류는 6개월 이상으로 하며 투여는 주 7일로 한다.

사) 검색방법

(1) 각 군의 전 예에 대해서 일반상태를 상세히 매일 관찰하고, 체중을 투여개시 후 1개월까지는 주 2회 이상, 그후 2개월간은 주 1회 이상 그후는 4주에 1회 이상 측정한다.

(2) 투여기간 중 개별 또는 군마다 사료 및 검체 등의 섭취량을 투여 개시후 1개월까지는 주 2회 이상, 그후 2개월간은 주 1회 이상 그후는 4주에 1회 이상 측정한다.

(3) 투여기간 중 각 군의 전부 또는 일부의 예에 대하여 1회 이상 뇨검사, 안과적 검사를 한다. 또, 검체의 화학구조, 약리작용 및 일반상태로부터 유추하여 적절한 임상검사를 추가하는 것이 바람직하다.

(4) 투여기간 중 사망 예에 대해서는 빨리 부검하여 기관·조직의 육안적 관찰, 중량 측정 및 병리조직학적 검색을 한다. 병리조직학적 검사의 대상으로 되는 기관·조직은 다음과 같으나 육안소견등으로부터 그 필요성이 인정되지 않는다고 판단되는 경우에는 그의 일부를 생략할 수 있다. [피부, 유선, 임파절, 타액선, 흉골, 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, 뇌*, 하수체*, 척수, 안구, 부누선(Harder's gland) 기타 육안으로 ³⁶변화가 인정된 기관·조직] 상기의 기

관·조직 중 *를 붙인 것에 대해서는 그 중량을 측정한다.

(5) 투여기간 중에 죽음이 임박한 예에 대하여는 빨리 도살부검하여(4)와 같이 기관·조직의 육안적 관찰, 중량측정 및 병리조직학적 검사를 한다. 또 도살시에 혈액을 채취하여 혈액학적 검사 및 혈액생화학적 검사를 하는 것이 바람직하다

(6) 투여종료시의 생존 예에 대하여는 도살 부검하여 (4)와 같이 각 군의 전 예에 대하여 기관·조직의 육안적 관찰 및 중량을 측정한다. 병리조직학적 검색은 원칙으로 대조군 및 최고 용량군의 전 예에 대하여 실시하나 다른 시험군에서 육안적으로 변화가 인정된 기관·조직이 있는 경우 또는 최고용량군에서 관찰된 변화로부터 고찰할 필요가 있는 경우에는 다른 시험군의 전예에 대하여서도 당해 기관·조직의 병리조직학적 검사를 한다. 또, 도살시에 혈액을 채취하여 혈액학적 검사 및 혈액 생화학적 검사를 한다. 검사항목은 가능한 한 많은 항목에 걸치는 것이 바람직하며, 각 항목의 측정에는 각각 국제적으로 널리 이용되는 방법 및 측정단위를 채용한다.

3) 만성독성시험

가) 동물 : 2종 이상의 동일 주령으로 순조로이 발육한 암·수의 동물로 하되, 그 중 1종은 설치류, 1종은 비설치류로 한다.

나) 동물수 : 설치류는 암·수 각각에 대하여 1군 10수이상으로 하고, 비설치류는 암·수 각각에 대하여 1군 3수 이상으로 한다. 동물에 큰 부담을 주는 특수검사, 중도도살 또는 회복시험을 실시하는 경우에는 그에 소요되는 동물수를 미리 추가한다.

다) 투여경로 : 임상적용경로 또는 경구투여로 한다. 경구투여의 경우에는 사료 아니면, 음수에 혼입하여 자유로이 섭취시키는 방법 또는 강제투여에 의한 방법이 있다.

라) 용량단계 : 암·수 각각에 대하여 3단계 이상의 시험군을 설정하는 것과 함께 별도로 대조군을 둔다. 아급성독성시험의 결과를 참고로 어떠한 독성변화가 나타나는 양 및 무독성량(NOAEL)을 구할 수 있는 투여량 및 군수를 결정한다. 사료 또는 음수에 혼입하여 투여하는 경우에는 사료섭취량 또는 음수량으로부터 검체 섭취량을 산출한다.

마) 대조군 : 음성대조를 둔다. 음성대조는 검체투여시에 각종 용매, 유화제 등을 필요로 하는 경우에는 그것만을 투여하는 군으로 한다. 또한 기타 무처리 대조군을 두는 것이 바람직하다.

바) 투여기간 : 설치류는 2년 정도로 하고, 비설치류는 2년 이상으로 하며 투여는 주 7일로 한다.

사) 검색방법

- (1) 각 군의 전 예에 대하여 일반상태를 상세히 매일 관찰하고, 체중을 투여 개시 후 1개월까지는 주 2회 이상, 그 후 2개월간은 주 1회이상, 그후는 4주에 1회 이상 측정한다.
- (2) 투여기간중 개별 또는 군마다 사료 및 검체 등의 섭취량을 투여 개시후 1개월까지는 2회 이상, 그 후 2개월간은 주 1회 이상, 그후는 4주에 1회 이상 측정한다.
- (3) 투여기간중 각군의 전부 또는 일부의 예에 대하여 1회 이상 뇨검사, 안과적 검사를 한다. 또, 필요하면 기타 임상검사를 실시한다.
- (4) 투여기간중의 사망예에 대하여는 빨리 부검하여 기관·조직의 육안적 관찰, 중량 측정 및 병리조직학적 검사를 한다. 병리조직학적 검사의 대상으로 되는 기관·조직은 다음과 같으나 육안소견등으로부터 그 필요성이 안정되지 않는다고 판단되는 경우에는 그의 일부를 생략할 수 있다. [피부, 유선, 임파절, 타액선, 흉골, 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, 뇌*, 하수체*, 척수, 안구, 부누선(Harder's gland), 기타 육안으로 변화가 인정된 기관·조직] 상기의 기관·조직 중 *를 붙인 것에 대해서는 그 중량을 측정한다.
- (5) 투여기간 중에 죽음이 임박한 예에 대하여는 빨리 도살부검하여 (4)와 같이 기관·조직의 육안적 관찰, 중량측정 및 병리조직학적 검사를 한다. 또 도살시에 혈액을 채취하여 혈액학적 검사 및 혈액 생화학적 검사를 하는 것이 바람직하다.
- (6) 투여종료시의 생존 예에 대하여는 도살 부검하여(4)와 같이 각군의 전예에 대하여는 기관·조직의 육안적 관찰 및 중량을 측정한다. 병리조직학적 검사는 원칙으로 대조군 및 최고용량군의 전 예에 대하여 실시하나 다른 시험군에서 육안적으로 변화가 인정된 기관·조직이 있는 경우 또는 최고 용량군에서 관찰된 변화로부터 고찰할 필요가 있는 경우에는 다른 시험군의 전 예에 대하여서도 당해 기관·조직의 병리조직학적 검사를 실시한다. 또, 도살시에 혈액을 채취하여 혈액학적 검사 및 혈액생화학적 검사를 실시한다. 검사항목은 가능한 많은 항목에 걸치는 것이 바람직하며³⁸⁾ 각 항목의 측정에는 각각 국제적으로

널리 이용되는 방법 및 측정단위를 채용한다.

2. 생식독성시험

가. 시험동물

- 1) 종 및 계통의 선택에 있어서는 수태능 등의 생식에 관한 지식, 자연발생기형의 발생빈도, 생식·발생에 악영향을 미치는 것이 확실히 알려져 있는 물질에 대한 감수성 등을 고려한다.
- 2) 기형새끼의 자연발현율이 낮은 종 및 계통을 선택하는 것이 바람직하다.
- 3) 최기형성시험 및 후세대 생식독성시험에 공통으로 사용되는 동물은 종 및 계통이 동일한 것이 바람직하다.

나. 시험방법

1) 최기형성시험

일반동물용의약품의 최기형성시험에 따른다.

2) 후세대 생식독성시험

가) 동물 : 설치류 등에서 선택한 1종이상의 암·수 동물로 한다. 일반적으로 랫트 또는 마우스가 사용된다.

나) 동물수 : 1군 20수 이상의 숫놈과 임신말기에서 원칙으로 1군 20수 이상의 임신 동물을 확보하기 위하여 필요한 암놈으로 한다.

다) 투여경로 : 원칙으로 임상적용경로로 한다. 경구투여의 경우에는 강제투여 또는 사료 아니면 음수에 혼입하여 자유로이 섭취시키는 방법이 있다.

라) 용량단계 : 3단계 이상의 시험군을 설정하는 것과 함께 별도로 대조군을 둔다. 최고용량은 사료섭취량의 저하, 체중증가의 억제 등 어떠한 뚜렷한 독성징후가 나타나는 최소량으로 한다. 기술적으로 투여 가능한 최대량에서도 독성징후가 나타나지 않는 경우에는 그 양을 최고용량으로 한다. 최저용량은 부모동물, 태자 또는 출생새끼의 어느 것에도 장애가 나타나지 않는 양으로 한다. 중간용량(복수인 것도 있다)은 원칙으로 최고용량과 최저용량의 등비중항으로 한다. 용량단계중에는 당해 사용동물에서 약리효과가 나타나는 양 또는 추정임상용량과 가까운 용량이 포함되는 것이 바람직하다.

마) 대조군 : 음성대조를 둔다. 또 필요에 따라서 양성대조 또는 비대조를 둔다. 음성대조는 검체 투여시에 각종용매, 유효제 등을 필요로 하는 경우에는 원칙으로 그것만을 투여하는 군으로 한다. 또 양성대조에는 생식에 악영향을 미치는 것이 확실히 알려져 있는 물질을, ³⁹비교대조에는 화학구조 또는 약효가 유사

한 기존 약물을 사용한다.

바) 투여기간 : 제 1세대 생식독성시험의 경우 설치류일때는 암·수 모두 8주령부터 8주간 이상 매일 투여한 후 교배시킨다. 교배는 3주간을 한도로 하여 동일한 수놈과 암놈을 1대1로 동거시킨다. 숫놈에 대하여는 교배기간 중에도 연속 투여하고, 암놈에 대하여는 교배기간중, 임신기간중 및 분만후 신생자의 이유까지의 기간에 투여를 계속한다. 제2세대 생식독성시험의 경우 제1세대 생식독성 시험에서 출산한 암·수 동물에 대하여 똑같은 방법으로 투여한다.

사) 검색방법

(1) 시험기간중 각 군의 전 예에 대하여 그의 생사 및 일반상태를 상세히 매일 관찰하고, 체중 및 사료 섭취량을 측정한다.

(2) 교배기간이 종료한 숫놈은 도살부검하여 기관·조직을 육안적으로 관찰한다. 교미가 성립하지 않은 암·수에 대하여는 그 원인을 조사한다. 교미율 및 수태율을 구한다. 이들은 통상 다음의 산출법에 의한다.

$$\text{교미율} = (\text{교미동물} / \text{동거동물}) \times 100$$

$$\text{수태율} = (\text{수태동물} / \text{교미동물}) \times 100$$

(3) 각군의 전 예를 분만포육 시킨다. 분만시에는 분만의 장애나 지연의 징후 등에 대하여 관찰한다. 어미의 수유·포육 본능에 대한 영향 등을 조사한다. 출산율을 구한다. 이는 통상 다음의 산출법에 의한다.

$$\text{출산율} = (\text{생자출산 암놈수} / \text{임신 암놈수}) \times 100$$

(4) 신생자에 대하여는 산자수, 그의 생사 성별 및 외표에서의 변화등을 조사하고 체중을 측정한다. 동복생자수를 조절하는 경우에는 생후 비교적 빠른 시기에 어미 한 마리당 수놈과 암놈이 거의 동수가 되도록 일정 마리수를 무작위로 채취하고 여분의 새끼를 도태 한다. 랫트 또는 마우스에서는 통상 생후 4일령에서 8마리 정도로 한다.

(5) 출생자에 대하여는 성장 및 발달과 함께 특이한 증상의 유무나 행동의 이상 등에 관하여 조사한다. 출생자에 이상소견이 보인 경우에는 필요에 따라 새로이 유모포육 시험을 실시하여 생후 어느 시기에서의 영향에 의한 것인가를 분석한다. 성장 및 발달에 대하여는 형태, 기능 및 행동에 관하여 검색한다. 또한 필요에 따라서 다시 장기간 관찰한다. 출생으로부터 이유까지의 사이에 출생율, 생존율 및 이유율을 구한다. 이들은 통상 다음의 산출법에 의한다.

$$\text{출생율} = (\text{출산생자 수} / \text{착상두 수}) \times 100$$

$$\text{4일생존율} = (\text{생후 4생일자 수} / \text{출산생자 수}) \times 100$$

이유율=(이유시 생자수/생후 4일의 생자수 또는 도태 직후의 생자수)×100

(6) 처치된 어미에 대하여는 적당한 시기에 부검하여 기관·조직을 육안적으로 관찰한다. 또 필요에 따라서 검체의 투여를 계속하여 다세대에 관한 검사를 실시한다.

3. 변이원성시험

일반 동물용의약품의 변이원성시험에 따른다.

4. 암원성시험

일반 동물용의약품의 암원성시험에 따른다.

5. 미생물학적 독성시험

일반 동물용의약품의 미생물학적 독성시험에 따른다.

6. 국소독성시험

일반 동물용의약품의 국소독성시험에 따른다.

7. 면역계이상시험

일반 동물용의약품의 면역계이상시험에 따른다.