

독성 평가 실험 프로토콜 설계 실무 매뉴얼

Manual for Design and Execution of Toxicity Testing Protocols

1 개요 및 목적 (Overview & Objectives)

본 매뉴얼은 화학물질, 의약품, 화장품, 의료기기 등의 안전성 평가를 위해 실시하는 독성 평가 실험의 프로토콜 설계 및 실무 수행 지침을 제공합니다.

1.1 기본 원칙

- **글로벌 가이드라인 준수:** OECD Test Guidelines (TG), ICH Guidelines, ISO 10993 등 국제 표준 적합성 확보.
- **GLP (Good Laboratory Practice) 기준 적용:** 시험의 재현성, 데이터의 신뢰성, 표준작업지침서(SOP) 준수.
- **동물복지 및 3R 원칙 적용:** 대체(Replacement), 감축(Reduction), 고통 완화(Refinement) 반영.

2 시험물질 정보 및 용매 선정 (Test Item Characterization)

실험 설계 전 시험물질의 물리화학적 성상을 명확히 파악하여 투여 및 노출 조건의 오차를 최소화해야 합니다.

2.1 시험물질 특성 분석 항목

1. **기본 정보:** CAS 번호, 순도(Purity), 로트 번호(Lot No.), 구조식, 분자량.
2. **물리화학적 특성 및 조제물 검증:** 성상(분말, 액체 등), 용해도(Solubility), pK_a , 분배계수($\log K_{ow}$), 안정성(빛, 열, 습도에 따른 변화), 조제물의 균일성, 안정성 및 농도 분석(Formulation Analysis) 조건 수립.
3. **보관 및 취급 조건:** 보관 온도(상온, 4°C , -20°C 등), MSDS 확인 및 안전 취급 수칙.

2.2 용매(Vehicle/Solvent) 선정 기준

- **우선 순위:** 멸균 생리식염수(Saline) > 주사용수(WFI) > 옥수수유/아몬드유 > DMSO / Ethanol / Tween-80.
- **유기용매 제한 농도 (*In vitro* 기준):**
 - DMSO: 세포 독성을 방지하기 위해 최종 노출 농도 0.1% ~ 0.5% (v/v) 이하 유지.
 - Ethanol: 최종 노출 농도 0.1% (v/v) 이하 유지.
- **대조군 설정:** 유기용매 사용 시 반드시 **용매 대조군(Vehicle Control)**을 독립 수립하여 유기용매 자체의 영향 평가.

3 시험계(Test System) 선정 및 관리

3.1 *In vitro* 세포 모델 선정

- 표준 세포주(Cell Lines):
 - 일반 세포독성: NIH-3T3 (섬유아세포), HEK-293 (신장), HepG2 (간세포)
 - 기관 특이적 독성: Primary hepatocytes, Cardiomyocytes, Induced Pluripotent Stem Cells (iPSC)
- 세포 계대 및 상태 관리:
 - Passage number 제한 (보통 20-30 계대 이내 사용).
 - 마이코플라스마(Mycoplasma) 오염 주기적 검증.

3.2 *In vivo* 동물 모델 선정

- 종(Species) 및 계통(Strain) 선택:
 - 설치류: SD Rat, Sprague-Dawley, ICR Mouse, C57BL/6
 - 비설치류: Beagle dog, Gottingen minipig
- 환경 조건 관리:
 - 온도: $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$, 습도: $50 \pm 20\%$, 조명 주기: 12시간 명/암 (12L/12D)
 - 순화 기간(Acclimatization): 최소 5-7일간 실시 및 상태 확인.

4 용량 설정 및 노출 설계 (Dose Formulation & Exposure Design)

4.1 예비 시험 (Dose Range Finding, DRF)

본 시험 전 최적의 용량 단계를 설정하기 위해 DRF 시험을 수행합니다.

- *In vitro*: $0.01 \mu\text{g/mL} \sim 1000 \mu\text{g/mL}$ 범위에서 10배 농도 구배(Log scale) 설정.
- *In vivo*: 소수 동물(군당 2-3마리)을 대상으로 고용량 단회 투여 후 개략의 치사량 또는 중독 증상 관찰.

4.2 본 시험 용량 구배 설정 법칙

- 최고 용량 (High Dose): 명확한 독성 반응 또는 가벼운 표적장기 독성이 관찰되지만 자발적 사망은 유발하지 않는 용량 (또는 한계 용량 2000 mg/kg).
- 중간 용량 (Mid Dose): 최고용량과 저용량 사이의 용량 반응 관계를 파악할 수 있는 등비 공비(공비 2-5) 설정.
- 저용량 (Low Dose): 무해용량(NOAEL) 추정을 목표로 하며, 임상 예상 노출량(AUC 또는 C_{max}) 대비 안전성 여치(Safety Margin, 보통 10-100배)를 고려하여 설정.
- 대조군 (Control Groups):
 1. 음성 대조군 (Negative/Vehicle Control): 시험물질 제외 동일 조건 처리.
 2. 양성 대조군 (Positive Control): 신뢰성 보증을 위한 상용 검증 물질 (예: 세포독성 - SDS, 유전독성 - EMS/MMS).

5 엔드포인트(Endpoints) 및 측정 파라미터

5.1 *In vitro* 세포 독성 평가 지표

1. 세포 생존율 (Cell Viability Assay):

- MTT / CCK-8 / WST-1 (대사 활성 측정)
- LDH Release Assay (세포막 손상 측정)
- Live/Dead Staining (형광 염색)

$$\text{Cell Viability (\%)} = \left(\frac{\text{Absorbance}_{\text{sample}} - \text{Absorbance}_{\text{blank}}}{\text{Absorbance}_{\text{control}} - \text{Absorbance}_{\text{blank}}} \right) \times 100$$

2. 세포사멸 기전 (Apoptosis / Necrosis):

- Annexin V / PI 염색 (FACS 분석)
- Caspase-3/7 활성 측정
- ROS (Reactive Oxygen Species) 측정

5.2 *In vivo* 생체 독성 평가 지표

1. 일반 증상 및 체중 관찰:

- 매일 1-2회 외관, 행동, 체온, 피모 상태, 행동 이상 관찰 및 기록.
- 체중 및 사료/음수 섭취량: 주 1-2회 주기적 측정.

2. 혈액학(Hematology) 및 혈액생화학(Clinical Chemistry):

- 혈액학: WBC, RBC, Hb, Hct, PLT, Differential count.
- 혈액생화학: AST, ALT, ALP, BUN, Creatinine, Total Protein, Albumin, Glucose, Total Cholesterol.

3. 부검 및 장기 중량 측정 (Autopsy & Organ Weight):

- 주요 장기 추출 및 절제: 간, 신장, 비장, 심장, 허파, 뇌, 고환/난소 등.
- 절대 장기 중량 및 상대 장기 중량(체중 대비 비율) 계산.

4. 조직병리 검사 (Histopathology):

- 10% 중성 완충 포르말린(NBF) 고정 후 패러핀 블록 제작, H&E 염색을 통한 병리적 변화 관찰 (단, 고환 및 안구 등 특수 장기는 Davidson's 또는 Modified Davidson's 고정액 사용 권장).

6 통계 처리 및 결과 산출 (Data Analysis & Dose-Response)

6.1 반수 억제/치사 농도 산출

- IC₅₀ / EC₅₀ / LC₅₀ 계산: 4-Parameter Logistic Regression (4PL) 또는 Probit Analysis 모델 적용.

6.2 통계학적 검증 절차

1. **1단계 (수집 데이터 정규성 검정):** Shapiro-Wilk Test 실시
 - 정규성 만족 시: 2단계 (등분산성 검정) 진행
 - 정규성 미만족 시: 비모수 검정인 Kruskal-Wallis Test 진행 → 사후 검정: Dunn's Post-hoc Test
2. **2단계 (등분산성 검정):** Bartlett Test 또는 Levene's Test 실시
 - 등분산 충족 시: 일원배치 분산분석(One-way ANOVA) → 사후 검정: Dunnett's Test
 - 이분산 관찰 시: Welch's ANOVA → 사후 검정: Dunnett's T3 Test

6.3 주요 독성 결정 지표 정의

- **NOAEL (No Observed Adverse Effect Level):** 투여군 중 통계적/생물학적으로 부작용이 관찰되지 않은 **최고 용량(Highest Dose Level)**.
- **LOAEL (Lowest Observed Adverse Effect Level):** 부작용이 관찰되기 시작하는 **최저 용량(Lowest Dose Level)**.
- **BMD (Benchmark Dose):** 통계적 모형을 통해 특정 반응 수준(예: 10% 변화)을 유발하는 노출 수준 계산.

7 신뢰성 보증 및 품질 관리 (GLP & QA)

1. **SOP 관리:** 모든 실험 절차는 사전에 승인된 표준작업지침서(SOP)에 따라 수행 및 기록되어야 함.
2. **원데이터(Raw Data) 작성 지침:**
 - 데이터 수정 시 취소선(Single line streak) 사용, 수정 사유, 일자 및 서명 기재.
 - 백출/공란 금지, 날짜 형식 표준화 (YYYY-MM-DD).
3. **일탈(Deviation) 보고서 작성:**
 - 실험 중 계획서와 다른 상황 발생 시 즉시 일탈 작성, 독성학적 평가 및 시험 책임자(SD) 승인 획득.

8 실무 프로토콜 체크리스트 및 표준 양식

8.1 실험 계획서 작성 체크리스트

8.2 반복 투여 독성시험 개략 프로토콜 템플릿

1. **시험 제목 (Title):** [시험물질명]의 [동물종]을 이용한 [28일/90일] [경구/주사] 반복 투여 독성 시험
2. **시험 목적 (Objective):** 본 시험은 [시험물질명]을 [동물종]에 반복 투여 시 나타나는 개략적인 독성 양상 및 표적장기를 확인하고, 무해용량(NOAEL)을 산출하는 것을 목적으로 한다.
3. **시험계 (Test System):**
 - 종 및 계통: Specific Pathogen Free (SPF) SD Rat
 - 주령 및 성별: 6주령, 암/수 각 [N]마리

구 분	점검 항목	확인
기본 정보	시험 제목, 목적, 시험 책임자(SD), 연구 기관 및 의뢰자 정보 기재 여부	[]
시험물질	시험물질의 명칭, 로트 번호, 순도, 안정성 데이터 첨부 여부	[]
시험계	시험계 선택의 타당성 (세포 종류, 동물 종/계통/주령/성별/수)	[]
용량 설정	용량 설정의 근거 (DRF 결과, 기존 문헌 데이터 등) 명시 여부	[]
실험 설계	투여/노출 경로, 투여 기간, 용매 대조군 및 양성 대조군 설정 여부	[]
평가 항목	측정 엔드포인트 및 구체적인 측정 방법(분석 기기, 시약) 지정	[]
통계 방법	데이터 통계 분석 방법 및 소프트웨어 명시 여부	[]
IACUC/IRB	동물실험윤리위원회(IACUC) 또는 생명윤리위원회 승인 여부	[]

- 군 구성: G1 (음성 대조군: Vehicle), G2 (저용량군: [X] mg/kg/day), G3 (중간용량군: [Y] mg/kg/day), G4 (고용량군: [Z] mg/kg/day)

4. 투여 방법 (Administration):

- 투여 경로: 경구 투여 (Oral gavage) / 투여 용적: 10 mL/kg / 투여 기간: 28일간 매일 1회 반복 투여

5. 관찰 및 검사 항목 (Observations & Examinations):

- 일반 증상 관찰: 매일 1회 / 체중 및 사료 섭취량: 주 1회
- 안검사 및 기능 검사: 투여 마지막 주
- 임상병리 검사: 최종 투여 직후 채혈 (혈액학 및 혈액생화학)
- 병리 검사: 장기 중량 측정 및 주요 표적장기 조직병리 검사

6. 데이터 통계 분석 (Statistical Analysis): 연속형 변수(Continuous variables)에 대해 ANOVA 후 Dunnett's test 적용