

최종보고서

New Zealand White계 토끼를 이용한 토탈싹의 피부자극성시험

ATD-24020



(주)한국생물안전성연구소

2024. 11. 15. 14:00

제 출 문

시험물질 : 토탈삭

시험제목 : New Zealand White계 토끼를 이용한 토탈삭의 피부자극성시험

상기 독성시험을 농촌진흥청 고시 제2024-18호 “농약 및 원제의 등록기준” [별표 12] 인축 독성 시험기준과 방법에 준하여 실시하고 그 결과를 다음과 같이 제출합니다.

2024년 12월 26일

(주)한국생물안전성연구소

시험책임자 유 성 민 

인

목 차

[Contents]

보고서표지	1
제출문	2
목차 [Contents]	3
1. 요약 [Summary]	5
2. 시험실시의 개요 [Introduction]	6
2.1. 시험제목	6
2.2. 시험물질	6
2.3. 시험목적	6
2.4. 시험방법	6
2.5. 시험의뢰자	6
2.6. 시험기관	6
2.7. 시험장소	6
2.8. 시험책임자	6
2.9. 시험관계자	7
2.10. 시험일정	7
2.11. 시험물질의 보관	7
2.12. 시험자료의 보관	7
3. 시험재료 및 방법 [Materials and methods]	8
3.1. 시험물질	8
3.2. 실험동물	8
[표 1. 실험동물의 체중범위]	8
3.3. 사육환경 및 관리	9
3.4. 시험물질의 처리	9
4. 관찰 및 측정 [Observation and determination]	11
4.1. 일반증상 및 치사동물 관찰	11
4.2. 체중측정	11
4.3. 처리부위 관찰	11
4.4. 피부반응의 평가 및 자극성의 판정	11
[표 2. 피부반응 평가표]	11
[표 3. 피부 1차 자극표]	12
5. 시험결과 [Results]	13
5.1. 일반증상 및 치사동물 수	13
5.2. 체중변화	13
5.3. 피부반응의 평가	13

ATD-24020

5.4. 자극성의 판정	13
6. 참고문헌 [References]	14
7. Tables	15
Table 1. Mortality and clinical signs	15
Table 2. Body weight changes (Initial test animal)	16
Table 3. Body weight changes (Confirmation test animals)	16
Table 4. Evaluation of skin irritation	17
Table 5. Calculation of mean value - 24, 48 and 72 hours	19



1. 요약 [Summary]

New Zealand White계 토끼를 이용한 토탈싹의 피부자극성시험을 수행하여 일반증상, 치사수, 체중변화 및 피부자극성을 관찰·조사한 결과는 다음과 같다.

- 시험물질 0.5 g을 New Zealand White계 토끼에 처리한 결과 관찰기간 중 일반증상 및 치사동물은 관찰되지 않았다.
- 개체별 체중결과, 모든 개체에서 체중이 시간이 경과함에 따라 증가하였다.
- 시험물질 처리부위의 국소자극성을 관찰한 결과, 초기시험 개체에서 3분, 1시간, 4시간 처리 철폐에서 어떠한 증상도 관찰되지 않아 이후 4시간 철폐를 기준으로 관찰하였고, 4시간 철폐 제거 후 1시간째부터 14일째 관찰 시까지 어떠한 증상도 관찰되지 않았다. 확인시험 2번, 3번 개체에서도 1시간째부터 14일째 관찰 시까지 어떠한 증상도 관찰되지 않았다.
- 관찰 후 24, 48 및 72 시간의 홍반 및 가피, 부종의 평균점수는 모두 "0.00"이었다.

이상의 결과로부터 New Zealand White계 토끼를 이용한 피부자극성시험에서의 자극성은 [표 3. 피부 1차 자극표]에 의거 "없음"으로 구분되었다.



2. 시험실시의 개요 [Introduction]

2.1. 시험제목

New Zealand White계 토끼를 이용한 토탈싹의 피부자극성시험

2.2. 시험물질

토탈싹

2.3. 시험목적

토끼를 이용한 피부자극성시험을 통하여 유기농업자재 공시에 관한 기초자료로 활용코자 한다.

2.4. 시험방법

농촌진흥청 고시 제2024-18호 “농약 및 원제의 등록기준” [별표 12] 인축 독성 시험기준과 방법 중 12-1-4. 피부자극성 시험에 준하여 실시하였다.

2.5. 시험의뢰자

명칭: (주)케이엔텍

소재지: 경기도 화성시 우정읍 만곡동1길 42

2.6. 시험기관

명칭: (주)한국생물안전성연구소

소재지: 충청북도 음성군 감곡면 성주로 362-20

연락처: Tel) 043-882-0297, Fax) 043-882-0298

2.7. 시험장소

명칭: (주)한국생물안전성연구소 GLP 연구 C동 동물실험실

소재지: 충청북도 음성군 감곡면 성주로 362-20

2.8. 시험책임자

성명: 유성민

소속: (주)한국생물안전성연구소 독성연구팀

본 시험은 (주)케이엔텍의
유기농업자재 공시 시험을
위하여 실시되었습니다.

2.9. 시험관계자

시험물질의 조제: 염지영
시험물질의 노출: 유성민, 염지영
관찰/측정/평가: 유성민, 염지영
동물사육관리: 유성민, 염지영

2.10. 시험일정

동물입수일: 2024년 10월 28일
검역순화기간: 2024년 10월 28일 ~ 2024년 11월 05일 (초기시험)
2024년 10월 28일 ~ 2024년 11월 12일 (확인시험)
실험동물 제모일: 2024년 11월 04일 (초기시험)
2024년 11월 11일 (확인시험)
시험물질 처리일: 2024년 11월 05일 (초기시험)
2024년 11월 12일 (확인시험)
일반증상관찰기간: 2024년 11월 05일 ~ 2024년 11월 19일 (초기시험)
2024년 11월 12일 ~ 2024년 11월 26일 (확인시험)
실험종료일: 2024년 11월 26일
최종보고서 제출일: 2024년 12월 26일

2.11. 시험물질의 보관

본시험에 사용한 시험물질은 당 연구소 시험물질보관고에 보관하였다.
시료번호: 24-1-027
시험물질보관기간: 유기농업자재 공시 후 3년

2.12. 시험자료의 보관

본시험의 시험기초자료 및 관계시험성적서는 당 연구소 자료보관실에 보관하였다.
시험번호: ATD-24020
시험기초자료: 자료보관실
최종보고서: 자료보관실
자료하드디스크: 자료보관실
자료보관기간: 유기농업자재 공시 후 3년
자료관리담당자: 박동혁



3. 시험재료 및 방법 [Materials and methods]

3.1. 시험물질

- 3.1.1. 물질명: 토탈씩
- 3.1.2. 입수일: 2024년 08월 22일
- 3.1.3. 입수량: 1.5 kg
- 3.1.4. 시료번호: 24-1-027
- 3.1.5. 성상 및 외관: 고상, 회색
- 3.1.6. 주원료: 낭독추출물, 자몽종자추출물
- 3.1.7. 주원료 투입비율: 20% (낭독추출물 10%+자몽종자추출물 10%)
- 3.1.8. 보관조건: 상온
- 3.1.9. 공급원: (주)케이엔텍

3.2. 실험동물

3.2.1. 시험계: New Zealand White계 토끼

3.2.2. 공급원

- 명칭: 한림실험동물연구소
- 소재지: 경기도 화성시 정남면 괴랑2길 46-23
- 연락처: 031-366-6938

3.2.3. 시험계의 선택사유

농촌진흥청 고시 제2024-18호 인축 독성 시험기준과 방법에 백색토끼를 사용하도록 되어 있으며 New Zealand White계 토끼는 피부자극성시험에 널리 사용되고 있어 기초자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과 해석 및 평가가 용이하여 선택하였다.

3.2.4. 체중범위

[표 1. 실험동물의 체중범위]

구 분	처리 시 체중 (g)	
	초기시험	확인시험
실험동물	2055.1	2103.4, 2043.1

3.2.5. 순화 및 검역

동물을 입수한 후 초기 및 확인시험으로 각각 8일, 15일 동물실험실의 환경 하에서 순화시키면서 일반 건강상태를 관찰하여 건강한 개체만을 시험에 이용하였다.

3.2.6. 군분리

제모를 실시하여 피부에 이상이 없는 동물만 선택하여 시험하였다.

2024년 10월 22일

3.2.7. 개체식별

사육 상자에 개체식별정보를 부착하여 식별하였다.

3.3. 사육환경 및 관리

3.3.1. 사육환경

본 시험의 사육환경은 온도 $20\pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50\pm 20\%$, 환기시설 (공조기), 조명시간 12시간 (오전8시 ~ 오후8시)의 실험실 조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다.

3.3.2. 사육상자

순화 및 시험기간 중 stainless steel 사육상자 (380×490×346 mm)안에 넣어 사육하였다.

3.3.3. 사료 및 음용수

사료는 토끼용 펠릿사료 [Cargill Agri Purina Korea Inc.]를 자유 급식시켰으며 음용수는 정수필터 통과 및 자외선 살균한 수도수를 자유 섭취시켰다.

3.4. 시험물질의 처리

3.4.1. 시험군의 구성

실험동물은 건강하고 어린 동물로서 초기시험 1마리, 확인시험 2마리를 사용하였다.

3.4.2. 시험물질 조제

시험물질이 고상으로 막자사발을 이용하여 분쇄하고 표준체 (Standard test sieve, $250\mu\text{m}$)를 통과시켜 미세한 분말로 만들고 저울로 칭량하여 시험에 사용하였다.

3.4.3. 처리량 설정

처리량은 처리 군별 공히 0.5 g으로 설정하였다.

3.4.4. 처리방법

실험동물은 시험물질 처리 24시간 전에 전기면도기를 이용하여 경배부 (등부위)의 털을 15×15 cm 넓이로 제모한 다음 건강하고 깨끗한 피부를 가진 동물만을 사용하였다. 2×3 cm로 절개한 거즈를 이용하여 0.5 g의 시험물질을 거즈에 도포하고 증류수를 이용하여 습윤 처리한 후 처리 부위에 첩포한 뒤 시험물질의 유실 및 방출을 방지하기 위해 비자극성테이프 (Tegaderm, 3M)와 Coban (self-adherent wrap, 3M), 의료용테이프 (Micropore surgical tape, 3M)로 고정 및 유지시켜 시험물질이 경구 및 안점막 등 타 경로로 유입되지 않게 처리하였다. 대조부위는 증류수로 처리하여 처리부위와 증상관찰 비교 용도로 활용하였다.

3.4.5. 시험물질의 제거

초기시험은 3개의 시험물질 첩포를 순차적으로 적용하여 각각 3분, 1시간, 4

시간 후 패치를 제거하고 확인시험은 단일 첩포를 4시간 노출 후 제거하여 피부에 묻은 잔여물질은 증류수와 탈지면으로 잘 닦아내었다.

ATD-24020

4. 관찰 및 측정 [Observation and determination]

4.1. 일반증상 및 치사동물 관찰

시험물질 처리 후 14일째까지 일반증상 및 치사동물의 유·무를 관찰하였다.

4.2. 체중측정

시험물질 처리직전과 처리 후 48, 72시간, 7일 및 14일에 개체별 체중을 측정하였다.

4.3. 처리부위 관찰

시험물질 제거 후 14일째까지 부종, 홍반 및 가피형성 유·무를 관찰하였고, 초기시험은 확인시험 여부를 판정하기 위해 각각 3분, 1시간, 4시간 후 첩포를 제거한 뒤 피부 반응을 관찰하였다.

4.4. 피부반응의 평가 및 자극성의 판정

피부반응의 평가는 [표 2. 피부반응 평가표]에 준하여 실시하였고 결과에 대한 자극성은 [표 3. 피부 1차 자극표]의 자극성기준에 따라 자극성을 판정하였다.

[표 2. 피부반응 평가표]

(1) 홍반과 가피형성	
홍반이 전혀 없음	0
아주 가벼운 홍반 (육안으로 겨우 식별할 정도)	1
명확한 홍반	2
중간정도부터 심한 홍반	3
심한 홍반과 홍반을 평가할 수 없을 정도의 가피형성	4
총 가능한 홍반과 가피 점수	4
(2) 부종형성 평점	
부종이 전혀 없음	0
아주 가벼운 부종 (육안으로 겨우 식별할 정도)	1
가벼운 부종 (뚜렷하게 부어올라서 노출부위가 분명히 구별될 정도)	2
중간정도의 부종 (약 1 mm 정도 부어오른 상태)	3
심한 부종 (1 mm 이상 부어오르고 노출부위 밖까지 확장된 상태)	4
총 가능한 부종 점수	4



[표 3. 피부 1차 자극표]

구분	분류기준
강도	다음 어느 하나에 해당하는 물질 ① pH 2 이하 또는 pH 11.5 이상인 물질 ② 동물시험 결과 3마리 중 1마리 이상에서 시험 물질 노출 즉시 또는 4시간 노출 중에 피부 손상(부식 세포손상 등)이 나타나고 관련 증상이 14일까지 지속되는 경우
중도	다음 어느 하나에 해당하는 물질 ① 동물시험(3마리, 최대 4시간 노출 조건) 결과 24, 48 및 72시간에 대한 개체별 평균값이 적어도 2마리에서 해당 범위에 포함될 경우 (단, 반응이 늦게 발현된 경우에는 피부 반응 발생 후 3일간을 연속평가) $2.3 \leq \text{홍반 or 부종 평균값} \leq 4.0$ ② 동물시험(3마리, 최대 4시간 노출 조건) 결과 적어도 2마리의 시험동물에서 통상 14일간의 관찰기간 종료까지 염증, 특히 (제한된 부위에 대한)탈모증, 각화증, 비후(증식), 피부각질화 증상 등이 지속되는 경우
경도	동물시험(3마리, 최대 4시간 노출 조건) 결과 24, 48 및 72시간에 대한 개체별 평균값이 적어도 2마리에서 해당 범위에 포함될 경우 (단, 반응이 늦게 발현된 경우에는 피부 반응 발생 후 3일간을 연속평가) $1.5 \leq \text{홍반 or 부종 평균값} < 2.3$
없음	경도이상 분류기준에 해당하지 않는 경우

본 연구는 KCSI
Korea Chemical Safety
Information System
에 등록되어 있습니다.

5. 시험결과 [Results]

5.1. 일반증상 및 치사동물 수 (Table 1)

모든 시험동물에 있어서 어떠한 일반증상도 관찰되지 않았으며, 치사동물 또한 발견되지 않았다.

5.2. 체중변화 (Table 2, 3)

시험물질 처리직전, 처리 후 48시간, 72시간, 7일 및 14일에 개체별 체중을 측정한 결과, 시간이 경과함에 따라 증가추세를 보였다.

5.3. 피부반응의 평가 (Table 4)

초기시험 동물에 각각 3분, 1시간, 4시간 후 철폐를 제거한 뒤 피부 반응 관찰 시 증상이 관찰되지 않았다. 따라서 4시간 철폐를 기준으로 시험물질 노출 종료 후 72시간 까지 [표 2. 피부반응 평가표]를 이용하여 피부반응을 관찰한 결과는 아래와 같다.

1번 동물 (초기시험)

- 1시간째 관찰 시부터 14일째 관찰 시까지 어떠한 증상도 관찰되지 않았다.

2번 동물 (확인시험)

- 1시간째 관찰 시부터 14일째 관찰 시까지 어떠한 증상도 관찰되지 않았다.

3번 동물 (확인시험)

- 1시간째 관찰 시부터 14일째 관찰 시까지 어떠한 증상도 관찰되지 않았다.

5.4. 자극성의 판정 (Table 5)

초기시험과 확인시험을 [표 2. 피부반응 평가표]에 의해 개체별 평균값을 산출한 결과, 각 개체의 24, 48 및 72 시간의 홍반 및 가피, 부종의 평균점수는 모두 "0.00"이었다. 이상의 결과, New Zealand White계 토끼를 이용한 피부자극성시험에서 토탈싹의 자극성은 [표 3. 피부 1차 자극표]에 의거 "없음"으로 구분되었다.

KBSI

6. 참고문헌 [References]

- 농촌진흥청 고시 제2024-18호 「농약 및 원제의 등록기준」 [별표 12] 인축 독성 시험기준과 방법, 12-1-4. 피부자극성 시험 (2024.10.16)
- 국립농산물품질관리원 고시 제2020-20호 「유기농업자재 공시 기준」 (2020.12.08)
- OECD Guideline for the Testing of Chemicals, No. 404 「Acute Dermal Irritation/Corrosion」 (Adopted : July 28, 2015)

7. Tables

Table 1. Mortality and clinical signs (1/2)

Animal number	Days after application								Mortality
	0 (1hr)	1	2	3	4	5	6	7	
1	N ^a	N	N	N	N	N	N	N	0/3 ^b
2	N	N	N	N	N	N	N	N	
3	N	N	N	N	N	N	N	N	

a: Normal

b: Number of dead animals/Number of tested animals

Table 1. Mortality and clinical signs (2/2)

Animal number	Days after application							Mortality
	8	9	10	11	12	13	14	
1	N ^a	N	N	N	N	N	N	0/3 ^b
2	N	N	N	N	N	N	N	
3	N	N	N	N	N	N	N	

a: Normal

b: Number of dead animals/Number of tested animals

Table 2. Body weight changes (Initial test animal)

(unit: g)

Animal number	Days after application					
	0	2	3	7	14	Gain
1	2055.1	2097.2	2144.1	2203.2	2383.1	328.0

Table 3. Body weight changes (Confirmation test animals)

(unit: g)

Animal number	Days after application					
	0	2	3	7	14	Gain
2	2103.4	2161.8	2193.4	2253.2	2441.2	337.8
3	2043.1	2101.7	2136.5	2193.7	2418.7	375.6
Mean	2073.3	2131.8	2165.0	2223.5	2430.0	356.7
S.D. ^a	42.6	42.5	40.2	42.1	15.9	-

a: Standard Deviation

Table 4. Evaluation of skin irritation (1/3)

Sites	Phases	Animal number	Duration of application of test substance		
			3 min	1 hr	4 hr
Test sites	Erythema & Eschar	1	0	0	0
	Edema		0	0	0

Table 4. Evaluation of skin irritation (2/3)

Sites	Phases	Animal number	Days after application							
			0 (1hr)	1	2	3	4	5	6	7
Control sites	Erythema & Eschar	1	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	0	0	0
	Edema	1	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	0	0	0
Test sites	Erythema & Eschar	1	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	0	0	0
	Edema	1	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	0	0	0

ATD-24020

Table 4. Evaluation of skin irritation (3/3)

Sites	Phases	Number of animals	Days after application						
			8	9	10	11	12	13	14
Control sites	Erythema & Eschar	1	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	0	0
	Edema	1	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	0	0
Test sites	Erythema & Eschar	1	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	0	0
	Edema	1	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	0	0

Table 5. Calculation of mean value – 24, 48 and 72 hours

Number of animal	Erythema & Eschar	Edema
1	0.00	0.00
2	0.00	0.00
3	0.00	0.00

