

최종보고서

New Zealand White계 토끼를 이용한 토탈싹의 안점막자극성시험

ATE-24020



(주)한국생물안전성연구소

본 보고서의
내용은
KBSI
의
비밀
정보
입니다.

제 출 문

시험물질 : 토탈삭

시험제목 : New Zealand White계 토끼를 이용한 토탈삭의 안점막자극성시험

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



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
[표 2. 시험군]	9
4. 관찰 및 측정 [Observation and determination]	10
4.1. 일반증상 및 치사동물 관찰	10
4.2. 체중측정	10
4.3. 안반응의 평가	10
4.4. 자극성의 평가	10
[표 3. 안반응 평가표]	10
[표 4. 안점막 자극표]	11
5. 시험결과 [Results]	12
5.1. 일반증상 및 치사동물 수	12
5.2. 체중변화	12

본 시험은 KCSI에서 수행되었습니다.

5.3. 안반응의 평가 결과	12
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)	15
Table 3. Body weight changes (Confirmation test animals)	15
Table 4. No eyes washed evaluation of eye irritation (Non-treatment)	16
Table 5. No eyes washed evaluation of eye irritation (Treatment)	17
Table 6. Calculation of mean value – 24, 48 and 72 hours	18

1. 요약 [Summary]

New Zealand White계 토끼를 이용한 토탈쌍의 안점막자극성시험을 수행하여 일반증상, 치사수, 체중변화 및 안점막 자극증상을 관찰·조사한 결과는 다음과 같다.

- 시험물질 0.1 g을 New Zealand White계 토끼에 처리한 결과 관찰기간 중 일반증상 및 치사동물은 관찰되지 않았다.
- 체중측정결과 모든 개체에서 체중이 시간이 경과함에 따라 증가하였다.
- 시험물질 처리 후 24, 48 및 72시간의 개체별 평균값을 산출한 결과, 각 개체의 각 막흔탁, 홍채반응의 평균점수는 모두 "0.00"이었고, 결막 발적의 평균점수는 "1.33", "0.67" 및 "0.67", 결막 부종의 평균점수는 "0.00", "0.33" 및 "0.33"이었다.

이상의 결과, 토탈쌍의 New Zealand White계 토끼를 이용한 안점막자극성시험에서 자극성은 [표 4. 안점막 자극표]에 의거 "없음"으로 구분되었다.

2. 시험실시의 개요 [Introduction]

2.1. 시험제목

New Zealand White계 토끼를 이용한 토탈싹의 안점막자극성시험

2.2. 시험물질

토탈싹

2.3. 시험목적

토끼를 이용한 안점막자극성시험을 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 12-1-5. 안점막자극성시험에 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 농약안전성평가
시험실시결과보고서
제출을 위하여 작성되었습니다.

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)
시험물질 처리일: 2024년 11월 05일 (초기시험)
2024년 11월 12일 (확인시험)
일반증상관찰기간: 2024년 11월 05일 ~ 2024년 11월 12일 (초기시험)
2024년 11월 12일 ~ 2024년 11월 15일 (확인시험)
시험종료일: 2024년 11월 15일
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: ATE-24020
시험기초자료: 자료보관실
최종보고서: 자료보관실
자료하드디스크: 자료보관실
자료보관기간: 유기농업자재 공시 후 3년
자료관리담당자: 박동혁

본 시험의 시험기초자료 및 관계시험성적서는 당 연구소 자료보관실에 보관하였다.

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 패랑2길 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 안점막자극성시험에 널리 사용되고 있으며 본 계통에 대한 기초자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험 결과 해석 및 평가가 용이하여 선택하였다.

3.2.4. 체중범위

[표 1. 실험동물의 체중범위]

구 분	처리 시 체중 (g)	
	초기시험	확인시험
실험동물	2070.2	2136.8, 2203.8

3.2.5. 순화 및 검역

동물을 입수한 후 초기 및 확인시험 각각 8일, 15일 동안 동물실험실의 환경 하에서 순화시키면서 일반 건강상태를 관찰하여 건강한 개체를 선별, 시험에 사용하였다.

3.2.6. 군분리

실험동물은 시험물질 처리 24시간 전에 육안으로 양쪽 눈을 검사하여 눈에

이상이 없는 동물을 사용하였다.

3.2.7. 개체식별

사육 상자에 개체식별정보를 부착하여 식별하였다.

3.3. 사육환경 및 관리

3.3.1. 사육환경

본 시험의 사육환경은 온도 $20\pm3^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50\pm20\%$, 환기시설 (공조기), 조명시간 12시간 (오전8시 ~ 오후8시)의 실험실 조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다.

3.3.2. 사육 상자

순화 및 시험기간 중 stainless steel 사육상자 (380×490×349 mm)안에 넣어 사육하였다.

3.3.3. 사료 및 음용수

사료는 토끼용 펠렛사료 [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

[표 2. 시험군]

군	동물수	좌우구분	처리
비세척군	3	좌 안	시험물질
		우 안	무 처 리

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 개체별로 0.1 g으로 설정하였다.

3.4.4. 처리방법

초기시험은 1마리의 동물을 사용하였으며 실험동물은 시험개시 전 24시간 이내에 육안으로 양쪽 눈을 검사하여 눈에 이상이 없는 동물로서 약제처리는 좌안의 하안검을 가볍게 잡아당겨 결막낭 내에 시험물질 0.1 g을 한 번에 넣어 처리하고 시험물질의 손실을 막기 위해 양안검을 느슨하게 맞춰 잡고 약 1초간 유지하였다. 무처리한 우안은 대조부위로 하여 처리부위와 증상관찰 비교 용도로 활용하였다. 초기시험에서 심한 눈 손상이 관찰되지 않아 이후 2마리의 동물을 사용하여 확인시험을 진행하였다.

KBSI

4. 관찰 및 측정 [Observation and determination]

4.1. 일반증상 및 치사동물 관찰

시험물질 처리 후 초기시험은 7일, 확인시험은 72시간까지 일반증상 및 치사동물의 유·무를 관찰하였다.

4.2. 체중측정

초기시험은 시험물질 처리직전과 처리 후 48, 72시간 및 7일에 확인시험은 시험물질 처리직전과 처리 후 48 및 72시간에 개체별 체중을 측정하였다.

4.3. 안반응의 평가

안반응의 평가는 [표 3. 안반응 평가표]에 따라 실시하였다. 시험물질 처리 후 1시간부터 초기시험은 7일, 확인시험은 72시간까지 각막혼탁, 홍채이상, 결막 발적, 부종 평점을 기록하였다.

4.4. 자극성의 평가

[표 3. 안반응 평가표]에 의해 개체별 자극정도를 평가하고 이 결과로 [표 4. 안점막 자극표]에 따라 자극성의 정도를 구분하였다.

[표 3. 안반응 평가표]

1) 각막	
혼탁 : 안구의 농후한 정도(가장 농후한 지점을 관찰함)	평점
◦ 화농이나 혼탁이 없음	0
◦ 혼탁이 분산 혹은 밀집되어 있으나(정상적인 투명성이 약간 둔화된 것과는 다름) 홍채의 말단이 명확히 관찰됨.....	1
◦ 반투명한 부분이 쉽게 관찰되면서 홍채의 말단이 약간 불명확함	2
◦ 진주색깔을 나타내면서 홍채의 말단이 관찰되지 않음, 동공의 크기가 가까스로 관측됨.....	3
◦ 각막이 불투명하고 혼탁 때문에 홍채가 관찰 안됨	4
2) 홍채	
반응치	
◦ 정상	0
◦ 현저한 주름의 형성, 충혈, 종창 혹은 각막주위에 중등도의 충혈을 보이거나 홍채가 빛에 대해 반응함	1
◦ 홍채가 빛에 대해 반응이 없거나 출혈 또는 대부분 파괴된 상태)	2
3) 결막	

발적(안검결막, 안구결막에 한함, 홍채 제외)	
◦ 혈관 정상	0
◦ 일부 혈관 충혈	1
◦ 얇은 심홍색을 띄거나 각각의 혈관이 쉽게 관찰 안됨	2
◦ 짙은 선홍색	3
결막부종	
◦ 부풀지 않음	0
◦ 정상보다 약간 종창(순막 포함)	1
◦ 안검의 부분적 외전을 동반한 현저한 종창	2
◦ 눈이 반쯤 잠길 정도의 안검의 종창	3
◦ 눈이 반 이상 잠길 정도의 안검의 종창	4

[표 4. 안점막 자극표]

구분	분류기준
강도	다음 어느 하나에 해당하는 물질 ① 피부 강도 자극성인 부식성 물질 ② pH 2 이하 또는 pH 11.5 이상인 물질 ③ 최소한 1마리의 동물에서 각막, 홍채 또는 결막에 대한 영향이 회복되지 않을 것이라 예상되거나 일반적으로 관찰기간 21일 내에 완전히 회복되지 않는 경우 ④ 시험동물 3마리 중 최소한 2마리에서, 시험물질 주입 후 24, 48 및 72시간에서의 평균 점수로서 계산된 수치가 아래 기준에 어느 하나라도 해당하는 경우: ○ 각막 불투명도 ≥ 3 ○ 홍채 > 1.5
중도	다음 어느 하나에 해당하는 물질 ① 피부 중도 자극성 물질 ② 동물 시험결과 3마리 중 최소한 2마리에서, 아래 기준에 어느 하나라도 해당되고, 관찰기간 21일 이내에 완전히 회복되는 경우 ○ 각막 불투명도 점수 ≥ 1 ○ 홍채 점수 ≥ 1 ○ 결막 발적 점수 ≥ 2 ○ 결막 부종 점수 ≥ 2
경도	중도 조건에 해당하는 자극성이 7일 이내에 완전히 회복되는 경우
없음	경도 이상에 해당하지 않는 경우

5. 시험결과 [Results]

5.1. 일반증상 및 치사동물 수 (Table 1)

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

5.2. 체중변화 (Table 2, 3)

시험물질 처리직전, 처리 후 48, 72시간 및 7일 (초기시험)에 개체별 체중을 측정한 결과, 시간이 경과함에 따라 증가추세를 보였다.

5.3. 안반응의 평가 결과 (Table 4, 5)

초기시험 후 심한 눈 손상이 관찰되지 않아 동일한 방법으로 확인시험을 진행하였다. 초기시험 및 확인시험의 안반응 평가 결과는 아래와 같다.

1번 동물 (초기시험)

- 무처리 대조군인 우안에서는 어떠한 자극성도 관찰되지 않았다.
- 1시간째 관찰 시 시험물질 처리군에서 결막의 발적에 대한 자극증상이 관찰되었고, 6일째까지 지속되었다.
- 7일째 관찰 시 시험물질 처리군에서 증상이 소실되어 정상으로 회복되었다.

2번 동물 (확인시험)

- 무처리 대조군인 우안에서는 어떠한 자극성도 관찰되지 않았다.
- 1시간째 관찰 시부터 24시간째 관찰 시까지 시험물질 처리군에서 결막의 발적 및 부종에 대한 자극증상이 관찰되었다.
- 48시간째 관찰 시 시험물질 처리군에서 결막의 부종은 소실되었고, 결막의 발적은 72시간째 관찰 시 시험물질 처리군에서 증상이 소실되어 정상으로 회복되었다.

3번 동물 (확인시험)

- 무처리 대조군인 우안에서는 어떠한 자극성도 관찰되지 않았다.
- 1시간째 관찰 시부터 24시간째 관찰 시까지 시험물질 처리군에서 결막의 발적 및 부종에 대한 자극증상이 관찰되었다.
- 48시간째 관찰 시 시험물질 처리군에서 결막의 부종은 소실되었고, 결막의 발적은 72시간째 관찰 시 시험물질 처리군에서 증상이 소실되어 정상으로 회복되었다.

본 시험은 KBSI
Korea Bio Safety Institute
에서 수행되었습니다.

5.4. 자극성의 판정 (Table 6)

초기시험과 확인시험을 [표 3. 안반응 평가표]에 의해 24, 48 및 72시간의 개체별 평균값을 산출한 결과, 각 개체의 각막혼탁, 홍채반응의 평균점수는 모두 "0.00"이었고, 결막 발적의 평균점수는 "1.33", "0.67" 및 "0.67", 결막 부종의 평균점수는 "0.00", "0.33" 및 "0.33"이었다. 이상의 시험결과, New Zealand White계 토끼를 이용한 안점막자극성시험에서 토탈싹의 자극성은 [표 4. 안점막 자극표]에 의거 "없음"으로 구분되었다.

11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100

6. 참고문헌 [References]

- 농촌진흥청 고시 제2024-18호 「농약 및 원제의 등록기준」 [별표 12] 인축 독성 시험기준과 방법, 12-1-5. 안점막자극성시험 (2024.10.16)
- 국립농산물품질관리원 고시 제2020-20호 「유기농업자재 공시 기준」 (2020.12.08)
- OECD Guideline for the Testing of Chemicals, No. 405 「Acute Eye Irritation/Corrosion」 (Corrected : Jul 4, 2023)

7. Tables

Table 1. Mortality and clinical signs

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	-	-	-	-	
3	N	N	N	N	-	-	-	-	

a: Normal

b: Number of dead animals/Number of tested animals

Table 2. Body weight changes (Initial test animal)

Group	Animal number	Days after application (g)				
		0	2	3	7	Gain
No eye washed	1	2070.2	2109.7	2124.8	2203.6	133.4

Table 3. Body weight changes (Confirmation test animals)

Group	Animal number	Days after application (g)			
		0	2	3	Gain
No eye washed	2	2136.8	2188.8	2221.6	84.8
	3	2203.8	2273.6	2308.1	104.3
	Mean	2170.3	2231.2	2264.9	94.5
	S.D. ^a	47.4	60.0	61.2	-

a: Standard Deviation

Table 4. No eyes washed evaluation of eye irritation (Non-treatment)

Time	Animal number	Corneal opacity : degree of density	Iris	Conjunctiva	
				Redness	Edema
1 hr	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
24 hr	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
48 hr	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
72 hr	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
4 d	1	0	0	0	0
	2	0	0	-	-
	3	0	0	-	-
5 d	1	0	0	0	0
	2	0	0	-	-
	3	0	0	-	-
6 d	1	0	0	0	0
	2	0	0	-	-
	3	0	0	-	-
7 d	1	0	0	0	0
	2	0	0	-	-
	3	0	0	-	-

Table 5. No eyes washed evaluation of eye irritation (Treatment)

Time	Animal number	Corneal opacity : degree of density	Iris	Conjunctiva	
				Redness	Edema
1 hr	1	0	0	2	0
	2	0	0	1	2
	3	0	0	1	2
24 hr	1	0	0	2	0
	2	0	0	1	1
	3	0	0	1	1
48 hr	1	0	0	1	0
	2	0	0	1	0
	3	0	0	1	0
72 hr	1	0	0	1	0
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
4 d	1	0	0	1	0
	2	0	0	-	-
	3	0	0	-	-
5 d	1	0	0	1	0
	2	0	0	-	-
	3	0	0	-	-
6 d	1	0	0	1	0
	2	0	0	-	-
	3	0	0	-	-
7 d	1	0	0	0	0
	2	0	0	-	-
	3	0	0	-	-

Table 6. Calculation of mean value – 24, 48 and 72 hours

Animal number	Corneal opacity : degree of density	Iris	Conjunctiva	
			Redness	Edema
1	0.00	0.00	1.33	0.00
2	0.00	0.00	0.67	0.33
3	0.00	0.00	0.67	0.33