

Originally published by the OECD in English under the title:  
OECD Guideline for the Testing of Chemicals Uterotrophic Bioassay in Rodents: A short-term screening test  
for oestrogenic properties  
© 2007 OECD  
All rights reserved.

© 2008 National Institute of Toxicological Research Korea Food and Drug Administration for this Korean  
edition  
Published by arrangement with the OECD, Paris.  
The quality of the Korean translation and its coherence with the original text is the responsibility of National  
Institute of Toxicological Research Korea Food and Drug Administration.

※ 이 가이드라인은 경제개발협력기구(OECD)에서 2007년 10월에 발표한 「OECD Guideline for the Testing of Chemicals Uterotrophic Bioassay in Rodents: A short-term screening test for oestrogenic properties」에 근거하여 OECD와의 협의에 의해 번역·작성한 것으로서 원본에 대한 저작권은 OECD에, 우리말 번역본에 대한 책임 및 저작권은 국립독성과학원에 있습니다.

## 발 간 사

독성물질 검색시험 결과의 신뢰성을 확보하기 위해서는 국제적으로 표준화된 검색시험법 확립이 필수적입니다. 경제협력개발기구(OECD)는 1998년부터 내분비계장애물질 검색시험법 개발 및 확립을 위한 국제 협력 검증 연구를 추진해 오고 있습니다. 국립독성과학원에서도 1999년부터 자궁비대반응시험을 시작으로 *in vivo* 및 *in vitro* 검색시험법 검증 연구에 지속적으로 참여하고 있습니다.

이러한 검증 연구의 첫 결과로 OECD는 2007년 10월 설치류의 자궁비대반응시험법 가이드라인을 제정·공표하였고, 이에 앞서 7월에는 항에스트로겐성 시험법에 대한 지침서를 발간하였습니다. 이에 우리 원 내분비장애평가과에서는 OECD 자궁비대반응시험법 가이드라인 및 지침서의 우리말 번역본을 발간하게 되었는데, 이는 우리나라 최초로 시험법 확립을 위한 검증 연구에 시작부터 전과정에 참여함으로써 국제적 가이드라인 제정에 기여하였을뿐만 아니라 이 분야 기술의 국가적 위상을 높이게 된 것에 큰 의미가 있다고 하겠습니다.

이 밖에도 내분비장애평가과에서는 「성선비대반응시험」 검증을 위한 국제협력 연구에도 참여하여 곧 가이드라인화를 앞두고 있고, H295R 세포를 이용한 스테로이드 호르몬 합성 시험법, 리포터유전자를 이용한 (항)에스트로겐성 시험 등 *in vitro* 검색시험법 검증을 위한 국제 협력 연구도 수행 중에 있습니다.

우리 원은 앞으로도 내분비계장애물질 검색시험법 검증을 위한 이러한 국제협력 연구에 지속적으로 참여함으로써 국제적으로 표준화된 내분비계 장애물질 검색시험법 프로토콜 및 가이드라인을 마련, 국내 관련 업계 및 연구계 등에 보급해 나아가고자 합니다. 우리의 이러한 노력이 REACH 실시 등 국제적 규제 추세 변화에 대응하기 위한 국내 관련 기술의 선진화 및 국가 경쟁력을 높이는 데 기여할 수 있기를 기대합니다.

2008년 8월

국립독성과학원장 조명행

# 차 례

1. 서론 .....	1
2. 초기 고려 사항 및 제한사항 .....	3
3. 시험의 원리 .....	7
4. 방법에 대한 설명 .....	8
동물 종의 선택 .....	8
사육 및 사료의 조건 .....	10
동물의 준비 .....	12
5. 시험방법 .....	13
실험실 숙련도 검증 .....	13
동물의 수와 조건 .....	14
미성숙 동물의 연령 .....	14
난소 절제술의 방법 .....	15
체중 .....	16
시험물질의 투여용량 .....	17
측정범위에 대한 고려사항 .....	18
시험물질의 투여 .....	19
관찰 .....	21
일반 및 임상 증상 관찰 .....	21
체중 및 사료 섭취량 .....	22



OECD/OCDE

440

Adopted:

16 October 2007

## OECD 화학물질 시험에 관한 가이드라인

설치류의 자궁비대반응시험:  
에스트로겐 활성화에 대한 단기 검색시험

### 1. 서 론

1. 경제협력개발기구(OECD)는 1998년 최우선적으로 잠재적인 내분비계장애물질의 검색 및 시험에 관한 기존 가이드라인을 개정하고 새로운 가이드라인을 제정하기 위한 활동을 시작하였다(1). 설치류의 자궁비대반응시험 가이드라인은 이러한 OECD 활동의 하나로 마련되었다. 본 가이드라인은 그 초안이 마련된 후, 이에 대한 상세한 배경자료를 수집하고(2)(3), 강력한 에스트로겐 표준물질, 약한 에스트로겐 수용체 작용제, 강한 에스트로겐 수용체 길항제와 음성 대조물질을 사용하여 시험의 타당성과 재현성을 확인하기 위한 광범위의 실험실내 및 실험실간의 연구(4)(5)(6)(7)(8)(9) 등 다양한 검증 프로그램을 실시하였다. 본 시험 가이드라인 440은 검증 시험 프로그램 중에 얻은 경험과 그것에 따라 에스트로겐 작용제를 사용해 얻은 시험결과의 산물이다.

2. 자궁비대반응시험은 1930년대에 시작된 단기 검색시험법(27)(28)으로 1962년에 처음으로 전문가 위원회에 의해 검색시험법으로 표준화되었다(32)(35). 이 시험은 자궁 무게의 증가 또는 자궁비대 반응에 근거한다(검토는 29 참조). 이 시험에서는, 화학물질이 천연 에스트로젠(예를 들면  $17\beta$ -estradiol의 작용제 또는 길항제)과 같은 생물학적 활성을 나타낼 수 있는지를 평가한다. 그러나 이 시험법은 길항제보다는 작용제 검색에 일반적으로 더 많이 사용된다. 자궁은 2가지 방법으로 에스트로젠에 반응한다. 초기 반응은 물이 흡수되면서 무게가 증가하는 것이며, 이런 반응 후에는 조직 성장에 따른 무게 증가가 이어진다(30). 랫드와 마우스의 자궁 반응은 질적으로 유사하다.

3. 자궁비대반응시험은 생체내(in vivo) 검색시험의 일종으로 "내분비계장애물질의 시험 및 평가에 관한 "OECD 개념적 분류체계"(부록 2)에 나타나 있다. 이 개념적 분류체계에서 자궁비대반응시험은 단일 내분비 기전, 즉 에스트로젠성(estrogenicity)에 대한 자료를 제공하는 생체내(in vivo) 시험으로서 3단계에 해당된다.

4. 자궁비대반응시험은 내분비계와 상호작용할 가능성이 있는 물질을 규명하기 위한 일련의 시험관내(in vitro) 및 생체내(in vivo) 시험법에 포함되는 것을 목적으로 하며, 궁극적으로는 인간의 건강 또는 환경의 위해성 평가를 가능하게 한다. OECD 검증 프로그램에서는 에스트로젠성 작용이 있는 화합물을 확인하기 위한 이 시험의 능력을 평가하기 위해 강한 에스트로젠성 물질과 약한 에스트로젠성 물질 모두

를 사용하였으며(4)(5)(6)(7)(8), 그 결과 실험실 내 및 실험실간의 재현성뿐만 아니라 에스트로겐성 물질에 대한 시험 절차의 민감성도 좋게 나타났다.

5. 음성 화합물과 관련하여, *in vitro* 수용체 결합 및 수용체 시험뿐만 아니라 자궁비대반응시험을 통해 이미 음성으로 보고된 단 하나의 "음성" 대조 화학물질이 검증 프로그램에 포함되었지만, OECD 검증 프로그램이 아닌 추가 시험자료들에 의해서도 에스트로겐성 물질의 검색을 위한 자궁비대반응시험의 특이성이 뒷받침되고 있다(16).

## 2. 초기 고려사항 및 제한사항

6. 에스트로겐성 및 항에스트로겐성 물질은 에스트로겐 수용체  $\alpha$  및  $\beta$ 에 대해 리간드로 작용하여 이들 수용체의 전사 작용을 활성화시키거나 저해시킬 수 있다. 화학물질의 이러한 작용은 생식 및 발달에 미치는 영향을 포함하여 인간의 건강에 유해한 영향을 초래할 수 있으므로 화학물질의 에스트로겐 작용 또는 길항 가능성을 신속하게 측정하고 평가할 필요성이 있다.

*In vitro*에서의 에스트로겐 수용체에 대한 리간드의 친화력 또는 리포터 유전자의 전사 활성화는 유익한 정보를 제공하지만, 가능한 유해성을 결정하는 몇 가지 요인 중 하나에 불과하다. 다른 결정 요인으로는 적어도 부분적으로 투여경로 및 시험 중인 화학물질에 따라 달라지는 체내 유입에 따른 대사 활성화 및 불활성화, 표적 조직에 대

한 분포 및 체외로의 배출이 포함될 수 있으며, 이러한 점에서 화학물질의 흡수-분포-대사-배설(ADME) 특징에 대한 정보가 미리 제공되지 않는 한, 적절한 조건 하에서 화학물질의 가능한 *in vivo* 활성을 검색해야 할 필요성이 발생된다. 자궁조직은 에스트로겐 자극에 반응하여 빠르고 왕성하게 성장하는데, 이러한 현상은 발정주기가 약 4일인 설치류에서 뚜렷하다. 설치류, 특히 랫드는 유해성 평가를 위한 독성연구에도 널리 이용되고 있어 설치류의 자궁은 에스트로겐성 및 항에스트로겐성 물질의 생체내 검색에 적합한 표적 기관이다.

7. 이 가이드라인은, 실험실내 및 실험실간 연구에서 신뢰성 및 재현성이 있는 것으로 나타난, OECD 검증 연구에 사용된 프로토콜에 근거한다(5)(7). 현재 2가지 방법 즉, 난소절제 성체 암컷 방법(OVX 방법)과 미성숙 난소 비절제 방법(미성숙 방법)을 이용할 수 있으며, OECD 검증 시험 프로그램에서 이 두 가지 방법 모두 유사한 민감성과 재현성을 나타냈다. 그러나 미성숙한 동물은 완전한 시상하부-뇌하수체-생식선(HPG) 축을 가진다는 점에서 다소 덜 특이적이지만 단순히 에스트로겐 수용체보다는 HPG 축과 상호작용하는 물질에 반응할 수 있다는 점에서는 난소절제 동물에 비해 더 넓은 범위의 조사가 가능하다. 랫드의 경우, HPG 축은 출생 후 약 15일에 기능을 시작하기 때문에 그 전에는 GnRH와 같은 처리로 성성숙을 가속화시킬 수 없다. 암컷은 성성숙에 이르는 과정에서, 질 개구 또는 배란을 일으키지 않는 몇 번의 침묵 주기(silent cycle)를 갖게 되는데, 이때에도 어느 정도의 호르몬 변동은 나타난다. 화학물질이 직간접적으로

HPG 축을 자극하는 경우에는 성조숙, 조기 배란 및 질개구 시기의 가속화가 초래된다. HPG 축에 작용하는 화학물질만 이런 작용을 하는 것이 아니라 대사에 의해 고수준의 에너지를 발생시킬 수 있는 사료섭취 또한 에스트로겐성 작용없이 성장을 촉진하고 질개구 시기를 가속화 시킬 것이다. 이러한 물질은 HPG 축이 작동하지 않기 때문에 OVX 동물에서 자궁비대 반응을 유도하지 않을 것이다.

8. 동물 보호 차원에서 미성숙 랫드를 이용하는 것이 좋으며, 동물을 외과적으로 전처리 하거나 발정기에 들어가는 징후를 보이는 동물의 사용은 피하는 것이 좋다. (30절 참조)

9. 자궁비대 반응이 전적으로 에스트로겐 활성화에 기인하는 것은 아니며, 즉 에스트로겐 또는 항에스트로겐 외의 화합물 또한 반응을 일으킬 수 있다. 예를 들어 비교적 고용량의 프로게스테론, 테스토스테론 또는 다양한 합성 프로게스틴 모두가 자극 반응을 일으킬 수 있으며(30), 모든 반응은 질의 케라틴화 및 각질화에 대해 조직학적으로 분석될 수 있다(30). 반응의 가능한 원인과 관계없이, 자궁비대반응 시험에서 양성 결과가 나오면 보통 추가 설명을 위한 실험을 시작해야 한다. 에스트로겐성의 추가적 증거는 에스트로겐 수용체 결합시험 및 전사 활성화 시험과 같은 *in vitro* 시험이나 암컷 성성숙 시험과 같은 *in vivo* 시험에서 얻을 수 있을 것이다.

10. 자궁비대반응시험이 *in vivo* 검색시험이라는 점을 감안하여, 이

시험법의 검증은 동물 보호와 단계적 시험 전략(tiered testing strategy) 모두를 고려하여 수행되었다. 이런 목적을 위해 이 시험법에서는 많은 화학물질에 대하여 주요 관심사인 에스트로겐성에 대한 재현성 및 민감성을 정확하게 검증하는데 노력이 집중된 반면, 시험의 항에스트로겐성 요소에는 상대적으로 적은 노력을 기울였다. 항에스트로겐 활성이 분명한(일부 에스트로겐 활성에 의해 은폐되지 않는) 물질의 수가 매우 제한적이기 때문에 활성이 강한 항에스트로겐은 단 1개만 시험되었다. 따라서 이 가이드라인에서는 에스트로겐성 시험에 대한 프로토콜만을 다루고 있으며, 항에스트로겐 활성을 검색, 시험하는 방법에 대한 프로토콜은 지침서에 포함되어 있다. 순수하게 항에스트로겐 활성을 가진 물질에 대한 시험의 재현성 및 민감성은 그 시험방법이 일정기간 동안 일반화되어 사용되고 이런 작용 방식을 갖는 더 많은 물질이 확인된 후에 더욱 분명하게 정의될 것이다.

11. 동물에 관련된 모든 절차는 동물 보호에 관한 지역 기준을 따르는 것으로 인정되고 있으며, 아래에 규정된 관리 및 취급에 대한 설명은 최소한의 이행 표준으로, 지역규정이 있는 경우, 지역 규정이 우선된다. 이 외에도 OECD는 인도적인 동물 취급에 대한 지침서를 제공하고 있다(25).

12. 살아 있는 동물을 이용하는 모든 시험과 마찬가지로, 자궁비대 반응 시험을 시작하기 전에는 이 시험자료가 정말로 필요한 지를 확인해야 한다. 예를 들어 다음의 두 조건이 이 시험의 자료가 필요한

경우이다:

- 노출 가능성이 높거나(분류체계, 부록 2의 1단계) 에스트로겐 효과가 in vivo에서도 일어날 수 있는 지 조사할 필요성을 제시하는 에스트로겐 활성을 보일 때(2단계)
- 그러한 효과가 in vitro 시험으로는 설명할 수 없는 에스트로겐성 메커니즘과 관련되어 있음을 실증하는 in vivo 시험인 4단계 또는 5단계에서 에스트로겐 활성을 시사하는 영향을 나타낼 때

13. 이 시험 가이드라인에서 사용된 용어에 대한 정의는 부록 1에 나타나 있다.

### 3. 시험의 원리

14. 자궁비대반응시험의 민감도는 시상하부-뇌하수체-생식선 축이 작동하지 않아 순환하는 내인성 에스트로겐 농도가 낮은 동물 시험 시스템에 좌우된다. 이렇게 되면 자궁 무게가 기본적으로 낮게 유지되어 투여된 에스트로겐에 최대한으로 반응하게 될 것이다. 설치류 암컷에서 다음과 같은 2가지 에스트로겐 민감성 상태가 이런 요건을 충족시킨다:

- i) 젖을 떼 성숙 이전의 미성숙한 암컷
- ii) 난소 절제 후 적절한 시간이 지나 자궁 조직이 퇴화한 어린 성체 암컷

15. 시험 물질은 경구 투여 또는 피하 주사를 통해 매일 투여한다. 시험물질은 최소 2개의 용량군에(자세한 내용은 33절 참조) 미성숙 방법의 경우 연속 3일간, OVX 방법의 경우에는 최소 3일간 연속적으로 투여하며, 마지막 투여 약 24시간 후에 동물을 부검한다. 에스트로겐성 물질의 경우 시험물질 투여군 동물의 평균 자궁무게가 대조군 동물의 자궁무게와 비교하여 통계적으로 유의한 증가가 있었는지를 평가한다. 시험물질 투여군의 평균 자궁 무게에 통계적으로 유의한 증가가 있는 경우 이 시험에서 양성 반응을 나타낸 것으로 판단한다.

#### 4. 방법에 대한 설명

##### 동물 종의 선택

16. 일반적으로 사용되는 실험용 설치류를 이용할 수 있으며, 한 예로 검증과정에서는 랫드 중 Sprague-Dawley와 Wistar 랫드가 사용되었다. 자궁의 반응성이 낮은 것으로 알려져 있거나 의심되는 계통은 사용하지 않아야 한다. 실험실에서는 26절과 27절에 기술된 바와 같이 사용된 동물 계통의 민감성을 증명해야 한다.

17. 랫드 및 마우스가 1930년대 이후 자궁비대반응시험에 일상적으로 사용되고 있다. OECD 검증연구에서는 두 종 모두가 동등할 것으로 예상되므로 자원과 동물을 절약하기 위해서는 한 종만으로도 전세계적인 검증에 충분하다는 이해에 근거하여 랫드만을 사용하였다.

랫드는 대부분의 생식 및 발생 독성 연구에서 선택되고 있는 종이다. 마우스에 대한 기존의 광범위한 역사적 데이터베이스가 존재한다는 사실을 고려하여 설치류에서 자궁비대반응시험 가이드라인의 범위를 마우스 사용으로 까지 확대시키기 위해, 마우스를 사용한 제한된 후속 검증연구가 실시되었다(16). 자원과 동물을 절약하기 위한 최초의 의도에 따라 시험 화학물질의 수가 제한되었으며 한정된 실험실이 참여하여 암호화된 시료 시험이 없는 가교 접근법(bridging approach)이 선택되어 왔다. 이런 가교 검증 연구에서 난소가 절제된 어린 성체 마우스를 이용한 자궁비대반응시험의 경우에는 랫드와 마우스에서 얻은 자료가 정량적, 정성적으로 서로 잘 맞음을 보여준다. 자궁비대반응시험 결과가 장기 연구에 대한 예비 연구가 될 수 있다면, 두 연구 모두에서 동일한 종과 기원의 동물을 사용할 수 있다. 가교 접근법은 OVX 마우스로 제한되어 실시되었으며, 이에 따라 보고서는 마우스 미성숙 모델에 대한 확실한 검증자료를 제공하지 않으므로 미성숙 마우스 모델은 현재의 시험 가이드라인(Test Guideline)에 포함되어 있지 않다.

18. 따라서 일부 경우에 랫드 대신 마우스를 사용할 수 있으며, 이 경우에는 사용하는 마우스에 대한 독성학적, 약물동태학적 및/또는 기타 기준에 근거한 이론적 근거를 제시하여야 하며, 마우스에 맞도록 프로토콜을 변경해야 할 수도 있다. 예를 들어 마우스는 체중 대비 사료 섭취량이 랫드보다 높기 때문에 마우스의 경우 랫드에 비해 사료 내 식물성 에스트로겐(phytoestrogen) 함량이 낮아야 한다(9)(29)(22).

## 사육 및 사료의 조건

19. 모든 절차는 실험용 동물 관리에 관한 지역 기준에 따라야 한다. 관리 및 취급에 대한 이런 설명은 최소한의 이행 기준으로, 지역 규정이 있는 경우, 지역 규정이 우선된다. 실험용 동물실의 온도는  $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ 로 유지해야 하며, 상대 습도는 최소 30%가 되어야 하고 청소할 때 이외에는 최고 70%를 넘지 않아야 한다. 상대 습도의 목표를 50-60%에 두고 조명은 인공 조명을 이용해야 한다. 일일 명암 주기는 밤을 12시간, 낮을 12시간으로 해야 한다.

20. 실험용 사료와 물은 자유로이 섭취할 수 있도록 공급되어야 하며, 어린 성체 동물의 경우 한 케이지에 한 마리씩 또는 3마리까지 넣을 수 있다. 미성숙 동물은 어리기 때문에 동물별 분리가 아닌 집단 수용을 권장한다.

21. 실험용 사료에서 식물성 에스트로겐의 함량이 높으면, 설치류의 자궁 무게가 자궁비대반응시험을 방해하는 정도까지 증가되는 것으로 알려져 있다(13)(14)(15). 미성숙 동물을 사용하는 경우, 실험용 사료에 식물성 에스트로겐의 함량과 대사에너지가 높아도 조기 성숙을 초래할 수 있다. 식물성 에스트로겐은 주로 실험용 사료에 콩과 알팔파가 포함되어 있는 제품에서 발견되고 그 농도는 표준 실험실 사료의 제조번호마다 다른 것으로 보인다(23). 체중은 사료섭취량과 관계가 있으므로 중요한 변수가 된다. 따라서 동일한 사료 내에서

도 실제로 섭취되는 식물성 에스트로겐의 양은 동물종 및 연령에 따라 달라질 수 있다(9). 미성숙 암컷 랫드의 경우 난소가 절제된 어린 성체 암컷에 비해 체중 대비 사료 섭취량이 약 2배가 될 수 있다. 어린 성체 마우스의 경우에는 난소가 절제된 어린 성체 암컷 랫드에 비해 체중 대비 사료 섭취량이 약 4배가 될 수 있다.

22. 그러나 자궁비대반응시험 결과(9)(17)(18)(19)에서, 사료 중 제한된 양의 식물성 에스트로겐은 허용될 만하며 시험의 민감성을 떨어 뜨리지 않는 것으로 나타났다. 한 가지 지침으로 미성숙 암컷 Sprague Dawley와 Wistar 랫드의 경우, 사료 중 식물성 에스트로겐의 양을 실험용 사료 1그램당 제니스테인으로 350 µg을 초과하지 않도록 하고 있다(6)(9). 체중 대비 사료 섭취량이 미성숙 동물에 비해 어린 성체에서 더 적다는 점에서 난소절제 어린 성체 랫드를 사용한 시험을 실시할 때에도 사료가 적절해야 한다. 난소가 절제된 성체 마우스 또는 식물성 에스트로겐에 민감성이 큰 랫드를 사용해야 하는 경우에는 사료 내 식물성 에스트로겐 농도의 비례적 감소를 고려해야 한다(20). 이 외에 사료별 대사 에너지의 효율 차이는 성숙 시기를 변화시킬 수 있다(21)(22).

23. 연구 시작에 앞서 식물성 에스트로겐(지침 (6)(9) 참조) 또는 대사 에너지가 높지 않은 사료를 신중히 선택해야 하며, 사료내 식물성 에스트로겐의 농도 또는 대사 에너지가 높으면 결과를 혼동시킬 수 있다(15),(17),(19),(22),(36). 26절과 27절에서 구체화 했듯이, 실험실

에서 사용되는 시험 시스템에 대해 적절한 작동을 확보하는 것은 이 두 가지 요인 모두에 대한 중요한 점검사항이다. GLP에 따른 안전장치로서 연구기간동안 투여된 사료에 대해 각 배치(batch)별 표본시료를 대상으로 식물성 에스트로겐의 함량(예를 들어 대조군의 자궁무게가 기존 연구에서의 대조군들에 비해 높거나 에스트로겐 표준물질(reference estrogen), 17- $\alpha$  ethinyl estradiol에 부적절한 반응을 보이는 경우)을 분석해야 한다. 분석전에 시료가 분해되는 것을 방지하기 위해서는 연구의 일부분으로 시료의 일정량을 분석하거나  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 냉동시키는 등의 적절한 조치를 취해야 한다.

24. 일부 깔짚 재료에는 자연적으로 발생하는 에스트로겐 또는 항에스트로겐성 물질이 포함될 수 있다(예를 들어 옥수수자루는 랫드의 주기성에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며 항에스트로겐성이 있는 것으로 보임). 최소한의 식물성 에스트로겐이 포함되어 있는 깔짚 재료를 선택해야 한다.

### 동물의 준비

25. 어떠한 질병이나 신체적 이상 징후가 없는 실험용 동물을 대조군과 처리군에 무작위로 배당한다. 케이지 배치는 배치로 인한 가능한 영향을 최소화 하는 방법으로 해야 한다. 동물은 개별적인 식별이 가능해야 하며, 미성숙 동물의 경우 적응기간 동안 젖을 땠 때까지는 한 케이지에 모체 또는 양육모와 함께 수용하는 것이 좋다. 어린 성체 동

물과 모체 또는 양육모와 함께 수용하는 미성숙 동물 모두 연구를 시작하기 전 약 5일 동안의 적응기간을 가져야 한다. 모체 없이 강제로 젖을 땀 미성숙 동물의 경우에는 젖을 땀 직후에 시험물질의 투여를 시작해야 하므로 적응기간의 단축이 필요할 수 있다. (29절 참조).

## 5. 시험방법

### 실험실 숙련도 검증

26. 실험실의 숙련도 검증에는 다음 두가지 방법 중 하나가 사용될 수 있다.

- **에스트로겐 표준물질 연구(Baseline Positive Control Study, 27절 참조)**에 근거한 주기적인 검증방법으로 적어도 6개월마다 그리고 시험의 성능에 영향을 미치는 변경 사항(예를 들면 사료의 성분, 부검자, 동물의 계통 또는 공급원 등의 변동)이 있을 때마다, 적절한 양 (27절에 기술된 baseline positive control study에 근거)의 에스트로겐 표준물질, 17- $\alpha$  ethinyl estradiol(EE, CAS No.: 57-63-6)을 사용하여 시험 시스템(동물 모델)의 반응성을 검증해야 한다.
- 매 시험마다 적절한 양의 에스트로겐 표준물질 투여군을 포함시켜 (동시에 여러개의 대조군을 사용하는) 검증하는 방법

시스템이 예상되는 대로 반응하지 않으면 실험조건을 조사해서 적절하게 변경해야 한다. 이때 사용되는 표준 에스트로겐의 양은 약 ED70-80을 권장한다.

27. **에스트로겐 표준물질 연구(Baseline Positive Control Study)** 실험실의 숙련도는 시험 가이드라인에 따라 연구를 처음 시작하기 전에, 동물 모델의 반응성을 시험함으로써, 최소 4가지 용량을 사용하여 에스트로겐 표준물질인 17- $\alpha$  ethinyl estradiol(EE, CAS No.: 57-63-6)의 용량 반응을 확립함으로써 증명되어야 한다. 자궁무게 반응을 확립된 기존 과거의 연구자료와 비교하며 (참고문헌(5) 참조), 이 연구에서 예상되는 결과가 나오지 않을 경우 실험 조건을 다시 검토하고 변경해야 한다.

### 동물의 수와 조건

28. 미성숙 방법과 OVX 방법 프로토콜 모두 각 투여군 및 대조군에는 최소 6마리의 동물이 포함되어야 한다.

### 미성숙 동물의 연령

29. 미성숙 동물을 이용한 자궁비대반응시험의 경우 출생일을 명기해야 하며, 시험 물질 투여가 끝났을 때 성성숙과 관련된 내인성 에스트로겐의 생리적 상승이 일어나지 않을 만큼 충분히 이른 시기에 투여를 시작해야 한다. 한편, 너무 어린 동물은 덜 민감할 수 있다는 증거가 있다. 각 실험실에 맞는 최적의 연령을 정하기 위해서는 성성숙에 관한 실험실 자체의 기초 자료를 고찰해야 한다.

일반적인 지침으로 랫드에서의 투여는 조기 이유, 즉 출생 후 18일 (postnatal day 18, 출생일을 postnatal day 0으로 산정) 직후에 시작할 수 있다. 랫드에서의 투여는 출생 후 21일에 완료하는 것이 좋지만 어떤 경우든 출생 후 25일 이전에는 완료해야 한다. 이 연령 후에는 시상하부-뇌하수체-생식선 축이 작동을 하고 내인성 에스트로겐 농도가 상승하기 시작하면서 자궁무게 평균과 군간 표준편차가 증가될 수 있기 때문이다(2)(3)(10)(11)(12).

### 난소 절제술의 방법

30. 난소가 절제된 암컷 랫드와 마우스(투여군과 대조군)의 경우, 난소 절제는 출생 후 6주와 8주 사이에 실시되어야 한다. 랫드의 경우, 자궁을 최소의 안정된 수준까지 퇴화되도록 하기 위해서는 난소 절제일과 첫 번째 투약일 사이에 최소 14일이 경과되어야 하며, 마우스의 경우에는 최소 7일이 경과되어야 한다. 소량의 난소 조직만으로도 상당한 수준의 순환 에스트로겐을 생성하기에 충분하므로(3), 사용전에 적어도 5일간 연속적으로 (랫드의 경우, 난소 절제 후 10-14일) 질내 상피세포를 관찰함으로써 동물을 검사해야 한다. 발정기에 들어 갈 징후가 보이는 동물은 사용하지 않아야 한다. 또한, 부검 시 난소 조직의 잔존 여부를 조사하여 난소 조직이 남아 있는 동물은 제외한다(3).

31. 난소 절제는 동물을 적절히 마취시킨 후 옆드려 놓고, 늑골 아래의

경계면과 장골 능선(ilic crest)의 중간 지점에서 세로로 약 1 cm, 허리 근육의 외측 가장자리에서 측면으로 수 밀리미터를 절개하여 등 바깥쪽 복벽을 열어야 한다. 난소를 복강에서 떼어내는 작업은 무균대위에서 실시해야 하며, 난관과 자궁 본체의 접합부에서 난소를 분리해 낸다. 과다 출혈이 없는지 확인한 후 봉합을 통해 복벽을 닫고 피부는 오토클립을 이용하거나 적절한 봉합을 통해 닫아야 한다. 봉합 부위는 Figure 1에 도식적으로 나타나 있다. 시술이 끝나면, 설치류 치료에 경험이 있는 수 의사가 권장하는 방식으로 적절하게 통증이 없도록 처리해야 한다.

## 체 중

32. OVX 방법에 있어, 자궁 무게는 에스트로겐과 같은 호르몬의 영향은 받지만 신체의 크기를 조절하는 성장인자에는 영향을 받지 않으므로 체중과는 서로 관련성이 없다. 이와는 반대로 미성숙 모델에서는 성숙하는 동안 체중과 자궁 무게는 상호 관련성이 있다(34). 따라서 미성숙 모델을 사용할 때는 연구 시작 시, 사용하는 동물 체중의 편차를 최소한으로 하여 평균 체중의  $\pm 20\%$ 를 초과하지 않도록 해야 한다. 따라서 사육자는 어미가 다른 새끼들이 거의 동일하게 사육될 수 있도록 한배 새끼의 크기를 조절해야 한다. 동물은 군간의 평균 체중이 통계학적으로 다르지 않도록 대조군 및 투여군에 무작위로 배분해야 한다. 모체가 동일한 새끼를 같은 군에 배분하지 않고도 실험을 수행할 수 있는지에 대한 고려가 있어야 한다.

### 시험물질의 투여용량

33. 시험물질이 in vivo에서 에스트로겐 작용이 있는지의 여부를 확인하기 위해서는 일반적으로 두 용량의 시험군과 하나의 대조군만으로 충분하며, 이러한 실험설계는 동물 보호 차원에서도 선호된다. 용량-반응곡선을 얻거나 저용량으로의 외삽이 목적이라면, 적어도 세 용량의 시험군이 필요하다. 에스트로겐 활성 확인 이상의 정보(에스트로겐 효력 추정 등)가 요구되는 경우에는 투여 용량의 변경을 고려해야 한다. 대조군 동물도 시험물질 투여를 제외하고는 시험물질 투여군 동물들과 동일하게 처리되어야 한다. 시험물질 투여 시 용매를 사용한다면, 대조군에도 시험군에 사용하는 것과 동일한 양의 용매(시험군별로 사용할 용매의 양이 다르다면 사용할 최고량)를 투여해야 한다.

34. 자궁비대반응시험의 목적은 화학물질을 최대 1000 mg/kg/day까지 3일간 연속 투여했을 때, 동물에 대한 현저한 독성이나 위해없이 동물의 생존을 보증하는 양을 정하는 것이다. 모든 용량은 시험 물질 또는 관련 재료에 대해 이용 가능한 기존의 독성 및 독성동태학 자료를 고려하여 결정하여야 한다. 최고 투여용량은 동물의 사망, 심각한 고통 또는 위해를 피하기 위해 LD50 및/또는 급성독성 정보를 먼저 고려해야 한다(24)(25)(26). 최고 투여용량은 최대 내성 용량(MTD)을 나타내야 한다. 양성 자궁비대반응을 유도하는 용량 수준에서 실시한 연구도 이 시험의 범위에 포함될 수 있다. 하나의 검색

시험으로써 용량사이의 간격을 크게 하는 것(예를 들어 3.2에서 로그 단위까지의 용량 증가에 상응하는 1/2 로그 단위)이 일반적으로 허용된다. 사용할 용량 설정과 관련하여 이용할 만한 적절한 자료가 없을 경우에는 용량결정시험을 실시할 수 있다.

35. 이에 대한 대안으로, 에스트로겐성 물질의 에스트로겐성 효능이 *in vitro*(또는 *in silico*) 시험 자료를 통해 예측될 수 있다면, 이를 용량 결정에 고려할 수 있다. 예를 들어 에스트로겐 표준물질(ethinyl estradiol)와 동등한 자궁비대 반응을 나타내는 시험 화학물질의 양은 *in vitro* 시험에서의 ethinyl estradiol 효력에 비교하여 추정될 수 있다. 최고 시험 용량은 이런 등가량에 적절한 인자, 예를 들어 10이나 100를 곱하여 구할 수 있다.

#### 측정 범위에 대한 고려사항

36. 필요하다면, 소수의 동물을 사용하여 측정 범위 설정을 위한 예비실험을 실시할 수 있다. 이런 점에서 동물에 대한 독성 또는 고통을 나타내는 임상적 징후를 규정할 때 사용되는 OECD 지침서 n° 19(25)를 이용할 수 있다. 투여 3일 후에 이러한 측정 범위 설정 연구 내에서 가능하다면, 마지막 투여 약 24시간 후에 자궁을 절개하여 무게를 측정할 수 있다. 이들 예비실험 자료는 본 실험계획 설계(최고·최저 용량 및 투여 용량군의 수 설정 등)에 참조할 수 있다.

## 시험물질의 투여

37. 시험물질은 경구투여하거나 피하 주사한다. 투여 경로를 선택할 때에는 인간에서의 화학물질 노출 경로와의 관련성(예를 들어 섭취인 경우에는 경구 투여, 흡입 또는 피부 흡수인 경우는 피하 주사)과 같은 독성학적 측면, 시험물질의 물리/화학적 성질 및 특히, 대사 및 동태(예를 들어 초회통과 대사를 받지 않아야 할 필요성, 특정 경로를 통한 효율 개선)에 관한 기존의 독성학적 정보 및 자료뿐만 아니라 동물 보호 관련 사항도 고려되어야 한다.

38. 먼저 수용액/현탁액의 사용이 가능하다면 이 두 용액의 사용을 고려한다. 그러나 대부분의 에스트로겐 리간드나 대사 전구물질은 소수성인 경향이 있으므로 용액/현탁액을 오일(예를 들어 옥수수, 땅콩, 참깨 또는 올리브 오일)에 섞어 사용하는 것이 가장 일반적이다. 그러나 이런 오일 용매는 칼로리와 지방 함량이 다르므로 총 대사 에너지(ME) 섭취량에 영향을 미칠 수 있는데, 이러한 영향은 자궁무계(특히 미성숙 방법에서)와 같은 측정된 종말점을 변경시킬 수 있다. (33). 따라서 사용하게 될 모든 용매는 연구 전에 용매가 없는 대조군과도 비교 시험해야 한다. 시험물질은 최소량의 95% 에탄올이나 기타 적절한 용제에 용해시킨 다음 시험물질의 용매를 넣어 실험에 사용할 농도로 희석시킬 수 있다. 용매는 그 독성 특징이 알려져 있어야 하며, 별도의 대조군으로 시험되어야 한다. 시험물질이 안정적이라고 생각되는 경우, 알맞은 열과 강한 기계적 작용을 이용해 시험물

질을 용해시킬 수 있으며 용매 내에서의 시험물질의 안정성이 측정되어야 한다. 연구 기간 동안 시험물질이 안정하다면, 하나의 시험물질 용액만으로 연구를 시작할 수 있으며, 시험 시작 시에 시험물질에 대한 등분 시료(aliquot) 한개를 준비하여 매일 투여 용량별로 희석하여 사용할 수 있다.

39. 투여 시기(기간 등)는 사용하는 모델에 좌우된다(미성숙 모델의 경우 29절, OVX 모델의 경우에는 30절 참조). 미성숙 암컷 랫드에는 3일간 연속적으로 매일 시험물질을 투여한다. 난소가 절제된 암컷 랫드의 경우에도 3일 투여가 권장되지만, 더 길게 노출시키는 것도 인정되며 이런 경우 활성이 약한 물질의 검출을 향상시킬 수 있다. OVX 마우스는 강력한 에스트로겐성 물질의 경우, 7일까지 연장하여도 현저한 이점이 없이 3일간의 적용으로 충분해야 한다. 그러나 이런 관계가 활성이 약한 에스트로겐의 경우, 검증 연구에서 증명되지 않았으므로 (16) OVX 마우스에서는 7일간 연속적으로 투여해야 한다. 투여는 매일 비슷한 시간에 해야 하며, 필요한 경우 투여용량은 동물의 체중을 감안(즉, 시험 물질 mg/체중 kg/일)하여 일정한 수준이 유지되도록 조정해야 한다. 체중에 근거한 실험동물별 투여량(test volume)의 차이는 투여 경로에 상관없이 체중에 기초하여 모든 용량이 일정한 부피가 되도록 투여 용액의 농도를 조정함으로써 최소화되어야 한다.

40. 시험물질을 경구로 투여하는 경우, 동물에 위관 또는 적합한 캐놀러를 삽입하여 매일 1회 투여한다. 한 번에 투여할 수 있는 액체의

최대량은 동물의 크기에 따라 다르다. 시험액의 투여량은 동물 보호에 관한 지역 가이드라인을 따르지만, 10 ml/체중 kg을 사용할 수 있는 수용액을 제외하고는 그 양이 5 ml/체중 kg을 초과하지 않아야 한다.

41. 피하 주사를 통해 시험 물질을 투여하는 경우에는 매일 1회 무균 바늘(23 또는 25 게이지) 및 투베르쿨린 주사기를 통해 견갑골 등쪽 또는 허리 부위에 시험물질을 투여해야 한다. 주사 부위를 면도하는 것은 선택사항이다. 투여량의 모든 손실, 주사 부위에서의 누출 또는 불완전한 투여가 발생한 경우에는 이 사항을 기록해야 하며, 랫드 한 마리당 1일 총 주사량은 10 ml/체중 kg을 사용할 수 있는 수용액을 제외하고는 5 ml/체중 kg을 초과하지 않아야 하며, 주사 부위 2곳에 나누어 투여한다.

## 관찰

### 일반 및 임상 증상 관찰

42. 임상 증상은 최소 1일 1회 관찰해야 하며, 독성 징후가 관찰된 경우에는 그 빈도를 증가시켜야 한다. 관찰은 매일 같은 시간에, 그리고 투약 후 최고의 효과가 예상되는 시기를 고려하여 실시하는 것이 좋다. 모든 동물을 대하여 사망률, 질병률과 행동, 피부, 털, 눈 및 점막변화, 분비 및 배설의 발생 및 자율 신경계 활동(유루, 기모, 동공의 크기, 비정상적인 호흡 패턴)과 같은 임상 증상을 관찰해야 한다.

## 체중 및 사료 섭취량

43. 모든 동물은 투여전(시험군별로 동물을 분리할 때)부터 매일 0.1 g 단위까지 체중을 측정해야 한다. 투여 기간 동안에 소비된 사료의 양은 선택적 방법으로 케이지당 사료통의 무게를 잴으로써 측정될 수 있으며, 사료섭취량 측정 결과는 랫드 한 마리가 하루에 섭취한 사료의 양을 g단위로 나타내야 한다.

## 자궁의 적출 및 무게의 측정

44. 마지막 투여 24시간 후에 랫드를 인도적인 방법으로 치사시킨다. 이상적인 부검은 결과에 모호한 영향을 미칠 수 있는 상위 또는 하위 용량군으로의 순서적 진행을 피하고, 무작위로 실시한다. 자궁비대반응시험의 목표는 자궁 내강액을 포함한 자궁 무게(wet uterus weight: 습 자궁 무게)와 내강액을 포함하지 않은 자궁 무게(blotted uterus weight: 제습 자궁무게)를 측정하는 것이다. 습 무게에는 자궁과 내강액의 내용물이 포함되고 제습 무게는 자궁 내강액의 내용물을 짜낸 후에 측정한다.

45. 미성숙 동물에서는 질의 절개 전에 질 개구 상태를 조사한다. 절개 절차는 복벽을 열고 치골결합에서부터 시작한다. 복벽을 연 다음, 자궁각과 난소가 존재하는 경우, 등쪽 복벽으로부터 이들 장기를 떼어낸다. 자궁과 질의 복측 및 측면에서 방광과 수뇨관을 제거하며, 질구와 회음부 피부의 접합부를 확인할 수 있을 때까지 직장과 질 사이의 섬유

성 유착을 떼어 낸다. Figure 2에서 보는 바와 같이 회음부 피부 사이의 접합부 바로 위의 질벽을 절개함으로써 몸에서 자궁과 질을 떼어 낸다. 각 자궁각의 배외측 전 길이를 따라 부착 지점에서 자궁 장간막을 부드럽게 절개하여 체벽으로부터 자궁을 떼어 내어야 한다. 체외로 적출된 자궁은 조직이 건조되지 않도록 충분히 신속하게 처리해야 하며, 건조에 따른 무게 감소는 자궁과 같이 작은 조직일수록 더 중요하다 (23). 난소가 존재한다면, 자궁각으로 부터 내강액이 손실되지 않도록 하면서 난관에서 난소를 제거한다. 난소가 절제된 동물의 경우, 난소 조직이 존재하는지 난소 조직이 남아있는지를 조사하고, 여분의 지방과 결합 조직은 잘라내야 한다. 질은 Figure 2에서 보는 바와 같이 경부가 자궁 본체에 계속 붙어 있도록 경부 바로 아래의 자궁에서 제거한다.

46. 각 자궁은 무게를 재기 전에 건조되지 않도록 계속 주의하면서 (즉, 생리수를 약간 적신 여과지를 용기 안에 넣을 수 있다) 고유의 표시를 하고 무게를 잰 용기(예를 들어 페트리디쉬 또는 플라스틱 무게측정 용기)에 옮겨 담아야 하며, 0.1 mg을 최소단위로 내강액이 포함된 자궁 무게를 측정한다(습 자궁무게).

47. 각 자궁을 개별적으로 처리하여 내강액을 제거한다. 자궁각 2개도 모두 세로로 구멍을 뚫거나 절개한다. 약간 젖은 상태의 여과지(예를 들어 Whatman No. 3) 위에 자궁을 올려 놓은 다음 약간 젖은 상태의 다른 여과지로 살짝 눌러 내강액을 완전히 제거한다. 0.1 mg을 최소단위로 내강액의 내용물이 제거된 자궁의 무게를 측정한다(제습 자궁무게).

48. 미성숙 랫드의 경우, 시험 종료 시의 자궁 무게가 적정 연령을 초과하지 않았음을 확실하게 하는데 사용될 수 있겠지만, 이 점에 있어서는 지금까지 실험실에서 사용한 랫드의 계통에 대한 자료가 결정적으로 중요한 역할을 한다(결과에 대한 해석은 56절 참조).

### 선택 조사

49. 자궁은 무게를 측정한 다음, Haematoxylin & Eosin(HE) 염색 후 조직 병리학적인 검사를 위해 10% 중성 포르말린에 고정시킬 수 있으며, 이에 따라 질도 조사할 수 있다(9절 참조). 이외에 정량적 비교를 위해 자궁내막상피의 형태를 측정할 수 있다.

## 6. 자료 및 보고

### 자료

50. 연구 자료에는 다음 사항이 포함되어야 한다:

- 시험 시작 시 동물의 수
- 시험 중에 사망한 것으로 발견되었거나 인도적 이유에서 치사시킨 동물의 수와 해당 동물 정보 및 사망하거나 치사시킨 날짜와 시간
- 독성 징후를 나타내는 동물의 수와 해당 동물 정보 및 모든 독성 징후의 발생 시점, 지속기간 및 심각성을 포함한 관찰된 독성 징후에 대한 설명

- 장애를 나타내는 동물의 수와 해당 동물 정보 및 장애의 형태에 대한 설명

51. 동물 각각에 대해 체중, 습 자궁무게 및 제습 자궁무게에 대한 자료를 기록해야 한다. 에스트로겐성 물질의 경우, 시험 물질의 투여가 통계적으로 유의한( $p < 0.05$ ) 자궁 무게의 증가를 초래하였는 지에 대한 판단은 단측 통계 분석(one-tailed statistical analysis)을 이용해야 하며, 시험물질 투여와 관련해서 제습 및 습 자궁 무게에 변화가 있었는 지를 분석하기 위해서는 적절한 통계 분석을 실시해야 한다. 예를 들어 부검 시의 체중을 공변수로 하여 공분산 분석(analysis of covariance: ANCOVA)을 이용해 자료를 평가할 수 있다. 자료 분석 전에 자궁 자료에 대해 분산-안정화 로그 변환을 실시할 수 있다. Dunnett 및 Hsu's test는 용매 대조군들에 대한 각 투여군의 쌍체 비교와 신뢰 구간 계산에 적합하며, 가능한 이상값을 탐지하고 분산의 동질성을 측정하기 위해서는 스튜던타이즈드 잔차 플롯(residual plot)을 이용할 수 있다. OECD 검증 프로그램에서는 통계 분석 시스템(SAS 연구소, Cary, NC), 버전 8의 PROC GLM을 이용해 이런 절차를 적용하였다(6)(7).

52. 최종 보고서에는 다음 사항이 포함되어야 한다:

### **시험 시설**

- 시험 책임자 및 시험 책임자의 의무

- 에스트로겐 표준물질에 대한 기준 시험 자료와 양성 대조물질에 대한 주기별 시험 자료(26절 및 27절 참조)

### 시험 물질

- 시험 물질의 특징
- 물리적 성질 및 관련된 물리화학적 특성
- 희석물의 제조 방법 및 빈도
- 안정성과 관련하여 발생된 모든 자료
- 투여 용액에 대한 모든 분석 자료

### 시험 용매

- 시험 용매의 특징(성질, 공급처 및 제조번호)
- 시험 용매 선택의 정당성(물 제외)

### 시험 동물

- 동물종, 계통 및 선택의 정당성
- 공급원 및 공급원의 특수 시설
- 출생일 및 공급 시 연령
- 미성숙 동물의 경우, 모체 또는 양육모와 함께 공급되었는 지의 여부와 젖을 떼 날짜
- 동물의 새로운 환경 적응 과정에 대한 상세기술
- 케이지 1개당 수용 동물의 수
- 각각의 동물 및 투여군 식별과 관련한 세부 내용 및 방법

## 시험 조건

- 무작위화 과정에 대한 상세 기술(즉, 사용한 방법)
- 투여 용량 선정의 이론적 근거
- 시험 물질의 조성, 획득 농도, 안정성 및 동질성에 대한 세부 내용
- 시험 물질 투여에 대한 세부 내용 및 노출 경로 선정의 이론적 근거
- 사료(명칭, 종류, 공급원, 내용물 및 알 수 있다면, 식물성 에스트로겐 함유량)
- 물의 공급원(수도물인 지 여과수인 지 등) 및 공급 방법(배관을 통해 대형 용기로부터 공급했는지 또는 병을 이용해 공급했는지 등)
- 깔짚(명칭, 종류, 공급원, 내용물)
- 동물 수용 상태, 조명 간격, 실내 온도 및 습도, 동물실 청소에 관한 기록
- 부검 및 자궁 무게 측정 절차에 대한 자세한 설명
- 통계 분석 절차에 대한 설명

## 결과

### 각각의 동물에 대해

- (최초 군 분리에서 부검 시까지) 매일 측정한 동물별 체중(최소 단위: 0.1g)
- 시험 물질 투여 시작 당시 연령(출생일을 0일로 산정)
- 투여 날짜와 시간

- 투여 산출량 및 투여량과 투여 중 또는 투여 후에 발생한 투여량 손실량에 대한 모든 관찰 내용
- 관련 증상 및 관찰 내용을 포함한 동물의 상태에 대한 일일 기록
- 사망 추정원인(연구 중에 빈사 또는 사망한 것으로 밝혀진 경우)
- 마지막 투여까지의 시간 간격을 포함하여 인도적인 사유로 치사 시킨 날짜와 시간
- 습 자궁무게(최소단위: 0.1 mg)와 자궁 적출 및 무게 측정 준비 과정에서 발생한 내강액 손실에 대한 모든 관찰 내용
- 제습 자궁무게(최소단위: 0.1 mg)

#### 각각의 동물군에 대해

- 매일 측정된 평균 체중(최소단위: 0.1 g)과 표준편차(최초 군 분리에서 부검 시까지)
- 습 자궁무게 및 제습 자궁무게의 평균(최소단위: 0.1 mg)과 표준편차
- 측정된 경우, 매일 측정된 사료 섭취량(동물 1마리당 소비한 사료의 그램으로 표시)
- 시험물질 투여군의 습 및 제습 자궁무게 모두에 대해 용매 대조군과 비교한 통계 분석 결과
- 시험물질 투여군의 총 체중 및 체중 증가량을 용매 대조군과 비교한 통계 분석 결과

## 53. 자궁비대반응시험 가이드라인의 중요 지침 요약

	랫 드	마우스
동 물		
계 통	일반적으로 사용되는 실험용 설치류	
동물의 수	투여군당 최소 6마리	
군의 수	최소 2개 시험군(33절 참조) 및 음성 대조군, 양성 대조군에 대한 지침은 26절 및 27절 참조	
사육 및 사료의 조건		
동물실의 온도(°C)	22°C±3°C	
상대 습도	50~60%, 30% 이상 또는 70% 미만	
일일 조명 주기	낮:12시간, 밤:12시간	
사료 및 물	무작위 자유 공급	
수 용	케이지당 1마리 또는 3마리까지(미성숙 동물의 경우, 동물별 분리가 아닌 집단 수용을 권장)	
사료 및 깔짚	식물성 에스트로겐 함유량이 낮은 사료 및 깔짚 사용을 권장	
프로토콜		
방 법	미성숙 난소 비절제 방법 (선호되는 방법) 난소 절제 성체 암컷 방법	난소 절제 성체 암컷 방법
미성숙 동물의 투여 연령	최초 투여는 출생 후 18일 (PND 18)에 가능하며, 늦어도 출생 후 25일(PND 25)전에 투여를 완료해야 함	현 가이드라인에는 관련 지침 없음
난소 절제 연령	6~8주령	
난소가 절제된 동물의 투여 연령	첫 투여일은 난소절제술 후 최소 14일이 경과되어야 함	첫 투여일은 난소절제술 후 최소 7일이 경과되어야 함
체 중	체중 편차를 최소로 하고 평균 체중의 ±20%를 초과하지 않아야 함	
투 여		
투여 경로	경구 투여 또는 피하 주사	
투여 빈도	매일 1회 투여	
경구 투여량 및 주사량	≤5ml/체중 kg (수용액의 경우는 10ml/체중 kg까지 가능) (피하 경로의 경우에는 주사 부위 2곳에 나누어 투여)	
투여 기간	미성숙 모델의 경우 3일 연속 OVX 모델의 경우 최소 3일 연속	OVX-모델의 경우 7일 연속
부검 시기	마지막 투여 약 24시간 후	
결 과		
양성 반응	평균 자궁 무게(습 및/또는 제습)의 통계학적으로 유의한 증가	
표준 에스트로겐	17α-ethinyl estradiol	

## 7. 시험결과의 해석 및 수락에 대한 지침

54. 일반적으로 에스트로겐성에 대한 시험은 용매 대조군에 비해 적어도 고용량에서 통계학적으로 유의한 자궁 무게 증가( $p < 0.05$ )가 있는 경우 양성으로 간주해야 한다. 양성반응 결과는 투여 용량과 반응 규모 사이의 생물학적으로 개연성 있는 관계의 증명을 통해 추가적으로 입증되며, 시험물질의 중복되는 에스트로겐 및 항에스트로겐 활성이 용량-반응 곡선의 모양에 영향을 미칠 수 있다는 사실을 유념해야 한다.

55. 자료에 대한 의미 있는 해석이 가능하도록 최대 내성 용량을 초과하지 않도록 주의해야 하며, 이런 점에서 체중 감소, 임상적 징후 및 기타 연구 결과가 철저히 평가되어야 한다.

56. 자궁비대반응시험에서 나온 자료를 수락함에 있어 한 가지 중요한 고려사항은 용매 대조군의 자궁 무게이다. 대조 값이 높으면 시험의 반응성과 활성이 매우 약한 에스트로겐성 물질의 검출 능력을 손상시킬 수 있다. 문헌 검토 및 자궁비대반응시험 검증 연구자료는 대조군의 평균이 자연발생적으로(특히 미성숙 동물에서) 높게 나타날 수 있음을 시사하고 있다. (2)(3)(6)(9). 미성숙 랫드의 자궁 무게는 동물의 계통 또는 체중과 같은 여러 가지 변수에 좌우되므로, 최종적인 자궁 무게의 상한을 제시할 수 없다. 하나의 지침으로서, 미성숙 대조 랫드에서 제습 자궁무게가 40과 45 mg 사이에 있는 경우, 결과를 의심해야 하며 자궁 무게가 45 mg을 초과하면 재시험이 필요할

수도 있다. 하지만 이런 사실은 사례별로 고려해야 한다(3)(6)(8). 성체 랫드를 사용한 시험 시 난소 절제가 불완전하면 난소 조직이 잔존하여 내인성 에스트로겐을 생산, 자궁 무게의 퇴화를 늦출 수 있다.

57. 미성숙 암컷 랫드의 경우 용매 대조군의 제습 자궁무게가 체중의 0.09%보다 적고 난소가 절제된 어린 성체 암컷의 경우 0.04%보다 적으면 인정 가능한 결과를 생산한 것으로 보인다[표 31(2) 참조]. 대조 자궁 무게가 이들 수치보다 큰 경우 동물의 연령, 난소절제의 적절성, 사료 내 식물성 에스트로겐 함유 등을 포함한 다양한 관련 인자를 철저히 조사해야 하며 음성의 시험 결과(에스트로겐 활성을 시사하지 않음)를 주의해서 사용해야 한다.

58. 용매 대조군에 대한 역사적 연구자료를 실험실에 보존해야 하며, 17 $\alpha$ -ethinyl estradiol과 같은 에스트로겐 양성 표준물질(positive reference estrogen)에 대한 반응 자료 또한 실험실에 보존되어야 한다. 실험실에서는 활성이 약한 것으로 알려진 에스트로겐성 물질에 대한 반응도 시험할 수 있으며, 이 모든 자료가 이용 가능한 자료와 비교하여 (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8) 실험실에서 사용하는 방법이 충분히 민감함을 확실하게 하는데 사용될 수 있다.

59. OECD 검증 연구 과정에서 제습 자궁무게가 습 자궁무게에 비해 연구결과 차이가 적은 것으로 나타났지만 (6)(7), 이 두 무게 중 어떤 측정에서든 유의한 반응이 나오면 시험 물질이 에스트로겐 활성에 양성임을 나타낸다.

60. 자궁비대반응이 전적으로 에스트로겐성에 기인하는 것은 아니지만, 자궁비대반응시험의 양성 결과는 일반적으로 in vivo에서 에스트로겐 활성을 나타낼 가능성이 있다는 증거로 해석해야 하며, 보통 추가 설명을 위한 행동을 시작해야 한다(9절 및 "내분비계장애물질의 시험 및 평가에 관한 OECD 분류체계", 부록 2 참조).

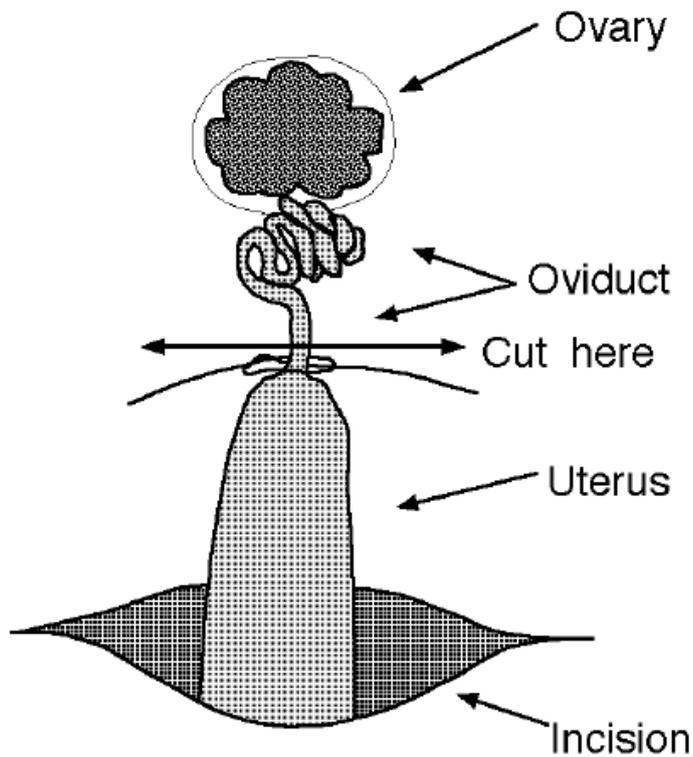


Figure 1: Schematic diagram showing the surgical removal of the ovaries

난소 절제는 갈비뼈 아래의 경계면과 엉덩뼈 능선의 중간 지점과, 허리 근육의 외측 가장자리 측면으로 수 밀리미터 지점에서 등 바깥쪽(dorso-lateral) 복벽을 여는 것으로 시작한다. 난소는 복강 내에 두고, 무균작업대 위에서 복강으로 부터 난소를 물리적으로 제거한다. 출혈을 조절하기 위해 난소와 자궁 사이에 봉합사를 넣고, 난관과 각 자궁각 접합부의 봉합사 위를 절개함으로써 난소를 떼어낸다. 큰 출혈이 지속되지 않음을 확인한 후, 복벽을 봉합하고, 피부는 오토클립을 이용하거나 봉합하여 닫는다. 동물은 원상태로 회복될 수 있어야 하며 자궁은 시험에 사용하기 전 최소 14일 동안 퇴화되도록 해야 한다.

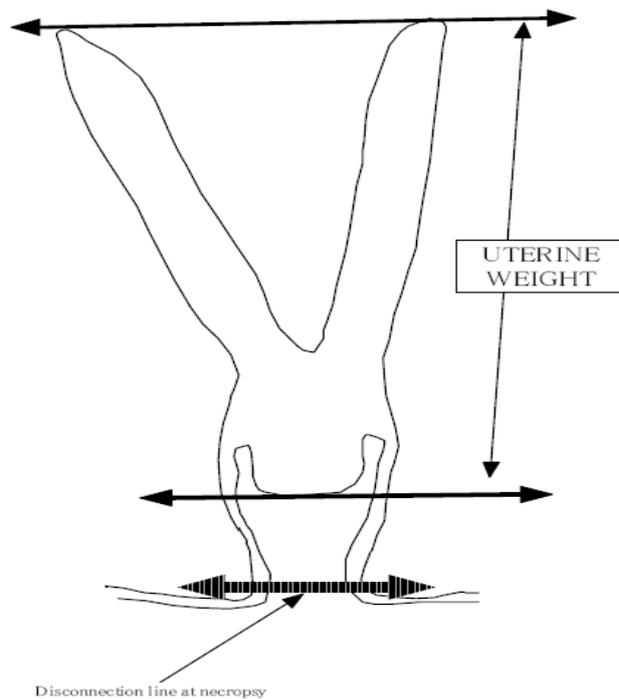


Figure 2: The removal and preparation of the uterine tissues for weight measurement

절개 절차는 치골결합에서 복벽을 열면서 시작된다. 복벽을 연 다음, 자궁각과 난소가 존재하는 경우, 등쪽(dorsal) 복벽으로부터 이들 조직을 떼어낸다. 자궁과 질의 복측 및 측면에서 방광과 수뇨관을 제거하며, 질구와 회음부 피부의 접합부를 확인할 수 있을 때까지 직장과 질 사이의 섬유성 유착을 떼어낸다. 그림에서 보는 바와 같이 회음 피부 사이의 접합부 바로 위의 질벽을 절개함으로써 몸에서 자궁과 질을 떼어낸다. 각 자궁각의 등 바깥쪽 전 길이를 따라 부착 지점에서 자궁 장간막을 부드럽게 절개하여 체벽으로 부터 자궁을 떼어 내어야 한다. 난소가 존재한다면, 자궁각으로 부터 내강액이 손실되지 않도록 하면서 난관에서 난소를 제거한다. 난소가 절제된 동물의 경우에는 난소조직이 남아 있는 지를 확인해야 한다. 그림에서 보듯이 경부가 자궁 본체에 계속 붙어 있도록 질을 경부 바로 아래의 자궁에서 제거한 후 자궁 무게를 측정한다.

## 부 록 1

### 정 의

Antioestrogenicity(항에스트로겐성)는 포유류에서 estradiol 17 $\beta$ 의 작용을 억제하는 화학물질의 성능을 말한다.

Date of birth(출생일)은 출생한 날(postnatal day 0)을 말한다.

Dosage(투여)는 투여량, 빈도 및 투여 기간으로 구성된 일반 용어이다.

Dose(투여량)은 투여하는 시험물질의 양을 말하며 자궁비대반응시험의 경우, 시험동물의 단위 체중당 1일에 투여하는 시험물질의 중량으로 표현한다(mg/체중 kg/일).

Maximum Tolerable Dose(MTD, 최대 내성 용량)은 시험물질이 체내에 들어갔을 때 시험동물이 죽지 않는 최고량을 말한다(DL<sub>0</sub>로 표시함)(IUPAC, 1993).

Oestrogenicity(에스트로겐성)는 포유류에서 estradiol 17 $\beta$ 와 같은 작용을 하는 화학물질의 효능이다.

Postnatal day X(출생후 X일)은 출생일 이후 살고 있는 X번째 날을 말한다.

Sensitivity(민감성)는 시험에 의해 정확하게 분류되는 모든 양성/활성 물질의 비율로, 분류별 결과를 생산하는 시험 방법의 정확성에 대한 척도가 되며, 시험 방법의 적절성을 평가하는데 있어 중요한 고려사항이다.

Specificity(특이성)은 시험에 의해 정확하게 분류되는 모든 음성/비활성 물질의 비율로, 분류별 결과를 생산하는 시험 방법의 정확성에 대한 척도가 되며, 시험 방법의 적절성을 평가하는데 있어 중요한 고려사항이다.

Uterotrophic(자궁비대)는 자궁 조직의 성장에 대한 양성의 영향을 설명하는데 사용되는 용어이다.

Validation(검증)은 시험 방법의 운용 요건 및 제한사항을 특정 짓고 특정 목적에 대한 시험방법의 신뢰성 및 적절성을 증명할 수 있도록 설계된 과학적인 과정이다.

## 부 록 2

주의 : 제6차 EDTA TF 회의에서 도달한 합의에 근거, 시험 가이드 라인 프로그램 사무국에서 작성한 문서

### 내분비계장애물질의 시험 및 평가에 관한 OECD 개념적 분류체계

#### 1단계

기존 정보에 근거한 분류 및 우선 순위 결정

- 물리화학적 특성, 예를 들어 분자량, 반응성, 휘발성, 생물 분해성
- 인간 및 환경 노출, 예를 들어 생산량, 배출, 사용 패턴
- 위험성, 예를 들어 이용 가능한 독성학적 자료

#### 2단계

기전 자료를 제공하는 in vitro 시험

- 에스트로젠, 안드로젠, 갑상선 호르몬 수용체 결합 친화력 시험
- 초고속 사전 검색 시험
- 전사 활성화 시험
- 갑상선 기능 시험
- 시험관내 아로마테이즈 및 스테로이드 합성 시험
- 어류 간세포 VTG(vitellogenin) 시험
- 방향족 탄화수소 수용체 인지/결합 시험
- 구조활성 예측 시험(QSARs)
- 기타(다른 적정한 것들)

### 3단계

단일 내분비 기전 및 영향에 대한 자료를 제공하는 생체내(in vivo) 시험

- 자궁비대반응시험(에스트로겐과 관련된)
- 성선비대반응시험(안드로겐과 관련된)
- 어류 VTG(vitellogenin) 시험(에스트로겐과 관련된)
- 수용체를 매개하지 않는 호르몬의 기능 시험
- 기타(예를 들어 갑상선)

### 4단계

복합적인 내분비 기전 및 영향에 대한 자료를 제공하는 생체내(in vivo) 시험

- 개선된 OECD 407(내분비 기전에 근거한 종말점)
- 어류 생식선에 관한 조직 병리 시험
- 수컷 및 암컷 성성숙 시험
- 성체 수컷 시험
- 개구리 변태 시험

### 5단계

내분비 및 다른 기전의 영향에 대한 자료를 제공하는 생체내(in vivo) 시험

- 1세대 시험(TG415 개선)<sup>1</sup>
- 2세대 시험(TG416 개선)<sup>1</sup>
- 어류, 조류, 양서류 및 무척추 동물에서
- 생식 검색 시험(TG421 개선)<sup>1</sup> 부분적 및 전체 일생 순환 주기 시험(발생 및 생식)

- 28일/생식 검색 통합 시험(TG422 개선)<sup>1</sup>

<sup>1</sup>VMG Mamm을 통해 시험의 개선 가능성이 고려될 것이다.

\* VMG Mamm : 포유류 시험 및 평가에 관한 검증 관리 그룹

### 분류체계에 대한 주의사항

주의 1 : 모든 단계에 들어가고 나갈 수 있으며 위험성 및 위해성 평가 목적을 위한 기존 정보 필요성의 성질에 좌우된다.

주의 2 : 5단계에서 생태독성학에는 유해 영향과 잠재적인 개체군 손상 기전을 나타내는 종말점이 포함되어야 한다.

주의 3 : 다작용 모델(Multimodal model)이 다수의 단일 종말점 시험을 가능하게 한다면, 이 모델은 이들 단일 종말점 시험 대신 사용될 수 있다.

주의 4 : 각 화학물질에 대한 평가는 사례별로 따로따로 해야 하며, 평가 시에는 가능한 모든 정보를 이용하고 분류 체계 각 단계의 기능을 염두에 두어야 한다.

주의 5 : 이 분류 체계가 현 시점에서의 모든 시험법을 포함하는 것으로 생각해서는 안된다. 3, 4, 5단계에는 이용 가능하거나 검증이 진행 중인 시험이 포함되어 있다. 후자에 해당되는 시험은 임시로 포함시킨 것이며, 이에 대한 개발 및 검증이 완료되면 공식적으로 분류 체계에 추가될 것이다.

주의 6 : 5단계에 최종적인 시험만 포함되어 있는 것으로 생각해서는 안된다. 이 5단계에 포함된 시험들은 일반적인 위험성 및 위해성 평가에 기여하는 것으로 생각되고 있다.

## 참고문헌

- (1) OECD. (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment(EDTA) Task Force, 10<sup>th</sup>–11<sup>th</sup> March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.
- (2) OECD. (2003). Detailed Background Review of the Uterotrophic Bioassay: Summary of the Available Literature in Support of the Project of the OECD Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment (EDTA) to Standardise and Validate the Uterotrophic Bioassay. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 38. ENV/JM/MONO(2003)1.
- (3) Owens JW, Ashby J. (2002). Critical Review and Evaluation of the Uterotrophic Bioassay for the Identification of Possible Estrogen Agonists and Antagonists: In Support of the Validation of the OECD Uterotrophic Protocols for the Laboratory Rodent. Crit. Rev. Toxicol. 32:445–520.
- (4) OECD (2006). OECD Report of the Initial Work Towards the Validation of the Rodent Uterotrophic Assay – Phase 1.OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 65. ENV/JM/MONO(2006)33.
- (5) Kanno, J, Onyon L, Haseman J, Fenner–Crisp P, Ashby J, Owens W. (2001). The OECD program to validate the rat

- uterotrophic bioassay to screen compounds for in vivo estrogenic responses: Phase 1. Environ Health Perspect. 109:785–94.
- (6) OECD (2006). OECD Report of the Validation of the Rodent Uterotrophic Bioassay : Phase 2 – Testing of Potent and Weak Oestrogen Agonists by Multiple Laboratories. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 66. ENV/JM/MONO(2006)34.
- (7) Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two – Dose Response Studies. Environ. Health Persp. 111:1530–1549.
- (8) Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two – Coded Single Dose Studies. Environ. Health Persp. 111:1550–1558.
- (9) Owens W, Ashby J, Odum J, Onyon L. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two – Dietary phytoestrogen analyses. Environ. Health Persp. 111:1559–1567
- (10) Ogasawara Y, Okamoto S, Kitamura Y, Matsumoto K. (1983). Proliferative pattern of uterine cells from birth to adulthood in intact, neonatally castrated, and/or adrenalectomized

- mice assayed by incorporation of [ $I^{125}$ ]iododeoxyuridine. *Endocrinology* 113:582–587
- (11) Branham WS, Sheehan DM, Zehr DR, Ridlon E, Nelson CJ. (1985). The postnatal ontogeny of rat uterine glands and age-related effects of  $17\beta$ -estradiol. *Endocrinology* 117:2229–2237.
- (12) Schlumpf M, Berger L, Cotton B, Conscience-Egli M, Durrer S, Fleischmann I, Haller V, Maerkel K, Lichtensteiger W. (2001). Estrogen active UV screens. *SOFW-J.* 127:10–15.
- (13) Zarrow MX, Lazo-Wasem EA, Shoger RL. (1953). Estrogenic activity in a commercial animal ration. *Science* 118:650–651
- (14) Drane HM, Patterson DSP, Roberts Ba, Saba N. (1975). The chance discovery of oestrogenic activity in laboratory rate cake. *Fd. Cosmet. Toxicol.* 13:425–427
- (15) Boettger-Tong H, Murphy L, Chiappetta C, Kirkland JL, Goodwin B, Adlercreutz H, Stancel Gm, Makela S. (1998). A case of a laboratory animal feed with high estrogenic activity and its impact on in vivo responses to exogenously administered estrogens. *Environ. Health Perspec.* 106:369–373.
- (16) OECD(2007). Additional data supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in rodents. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 67.

- 
- (17) Degen GH, Janning P, Diel P, Bolt HM. (2002). Estrogenic isoflavones in rodent diets. *Toxicol. Lett.* 128:145–157.
- (18) Wade MG, Lee A, McMahon A, Cooke G, Curran I. (2003). The influence of dietary isoflavone on the uterotrophic response in juvenile rats. *Food Chem. Toxicol.* 41:1517–1525.
- (19) Yamasaki K, Sawaki M, Noda S, Wada T, Hara T, Takatsuki M. (2002). Immature uterotrophic assay of estrogenic compounds in rats given different phytoestrogen content diets and the ovarian changes in the immature rat uterotrophic of estrogenic compounds with ICI 182,780 or antide. *Arch. Toxicol.* 76:613–620.
- (20) Thigpen JE, Haseman JK, Saunders HE, Setchell KDR, Grant MF, Forsythe D. (2003). Dietary phytoestrogens accelerate the time of vaginal opening in immature CD-1 mice. *Comp. Med.* 53:477–485
- (21) Ashby J, Tinwell H, Odum J, Kimber I, Brooks AN, Pate I, Boyle CC. (2000). Diet and the aetiology of temporal advances in human and rodent sexual development. *J. Appl. Toxicol.* 20:343–347.
- (22) Thigpen JE, Lockear J, Haseman J, Saunders HE, Caviness G, Grant MF, Forsythe DB. (2002). Dietary factors affecting uterine weights of immature CD-1 mice used in uterotrophic bioassays. *Cancer Detect. Prev.* 26:381–393.

- 
- (23) Thigpen JE, Li L-A, Richter CB, Lebetkin EH, Jameson CW. (1987). The mouse bioassay for the detection of estrogenic activity in rodent diets: I. A standardized method for conducting the mouse bioassay. *Lab. Anim. Sci.* 37:596:601
- (24) OECD (2001). Acute oral toxicity – up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals 425.
- (25) OECD (2000) Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.
- (26) OECD (2001) Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.
- (27) Bulbring, E., and Burn, J.H. (1935). The estimation of oestrin and of male hormone in oily solution. *J. Physiol.* 85:320–333.
- (28) Dorfman, R.I., Gallagher, T.F. and Koch, F.C (1936). The nature of the estrogenic substance in human male urine and bull testis. *Endocrinology* 19:33–41
- (29) Reel, J.R., Lamb IV, J.C. and Neal, B.H. (1996). Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization. *Fundam. Appl. Toxicol.* 34:288–305.

- (30) Jones, R.C. and Edgren, R.A. (1973). The effects of various steroid on the vaginal histology in the rat. *Fertil. Steril.* 24:284-291.
- (31) OECD (1982). Organization for Economic Co-operation and Development - Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 92-64-12367-9, Paris.
- (32) Dorfman R.I. (1962). *Methods in Hormone Research*, Vol. II, Part IV: Standard Methods Adopted by Official Organization. New York, Academic Press.
- (33) Thigpen J.E. et al.(2004) Selecting the appropriate rodent diet for endocrine disruptor research and testing studies. *ILAR J* 45(4): 401-416.
- (34) Gray L.E and Ostby J.(1998) Effects of pesticides and toxic substances on behavioral and morphological reproductive development: endocrine versus non-endocrine mechanism. *Toxicol Ind Health.* 14 (1-2): 159-184.
- (35) Booth AN, Bickoff EM and Kohler GO. (1960). Estrogen-like activity in vegetable oils and mill by-products. *Science* 131: 1807-1808.
- (36) Kato H, Iwata T, Katsu Y, Watanabe H, Ohta Y, Iguchi T (2004). Evaluation of estrogenic activity in diets for experimental animals using in vitro assay. *J. Agric Food Chem.* 52, 1410-1414.

# 부속 자료



# OECD 내분비계장애물질 검색시험법 가이드라인

제 1 권

---

발행년월일 2008년 8월

발 행 처 식품의약품안전청 국립독성과학원

발 행 인 조명행

편집위원장 장동덕

편 집 위 원 한순영, 김순선, 정기경, 강일현, 김태성,  
백정희, 홍진태(충북대학교), 육동연(충북대학교),  
김형식(부산대학교)

---

※ 내용 문의 및 의견 : 내분비장애평가과 김순선(sskeem@kfda.go.kr)