



인체각막상피유사모델을 이용한 농약의 안점막자극성 평가

조유미* · 이주연 · 박수진 · 유아선 · 오진아 · 이제봉 · 박연기¹ · 정미혜
국립농업과학원 농산물안전성부 농자재평가과, ¹국립식량과학원 작물기초기반과

Assessment of the Ocular Irritation Potential of Pesticides using Reconstructed Human Cornea-like Epithelium (RhCE) Model as Alternatives to Animal Testing

Youmi Jo*, Ju Yeon Lee, Soojin Park, Are-Sun You, Jin A Oh, Je Bong Lee, Yeon-Ki Park¹ and Mihye Jeong

Division of Agro-material Safety evaluation, Department of Agro-food Safety, National Institute of Agricultural Sciences, Wanjugun, Korea, Division of Crop Foundation

¹National Institute of Crop Science, Wanjugun, Korea

(Received on August 7, 2018. Revised on September 18, 2018. Accepted on September 19, 2018)

Abstract *In vitro* tests have currently accepted by the regulatory authorities for the identification of ocular irritant. However, there have been few studies conducted with agrochemical formulations. Also, ocular irritation potentials of plant protection products registered in Korea have been evaluated by the Korean Pesticide Control Act, not GHS classification system. The purpose of this study was to investigate whether the reconstructed cornea-like epithelium (RhCE) models, EpiOcularTM and HCETM, could be used to predict eye irritation potentials according to Korean and GHS classification scheme. Based on the OECD test guideline 492, EpiOcularTM and HCETM models were incubated respectively with 28 agrochemicals and the cell viability was measured as a parameter for irritation. The specificities of EpiOcularTM model were 50% and 25% for the Korean and GHS classification systems, meaning that it was necessary to enhance the predictive for ocular non-irritants. However, the sensitivities of EpiOcularTM model were 100% for the both systems. The specificities of HCETM model were higher than those of another model, but the sensitivities were relatively decreased for both scheme. However, because the overall specificity and sensitivity are high, HCETM would be useful tools for *in vitro* eye irritation testing when sensitivity is improved. RhCE models are suitable to evaluate ocular irritant pesticide for Korean classification system than GHS system. Taken together, non-animal testing using RhCE model was suitable to identify irritant materials and could be used as one of the testing strategies with other *in vitro* or *in vivo* tests.

Key words Alternatives to animal testing, Pesticide, Ocular irritation, Reconstructed human cornea-like epithelium

서 론

사람의 피부와 점막은 우발적 또는 의도적으로 농약에 노출될 수 있다. 국내에 농약을 등록·판매하기 위해 농약관리법에 따른 농약 및 원제의 등록기준 「농촌진흥청고시 제 2017-26호」에서는 국소독성시험성적을 필수적으로 제출하도록 하고 있다. 국소독성시험 중 하나로 안구나 점막에 물

질이 노출되었을 때 나타나는 독성을 평가하는 안점막자극성시험이 있다(RDA, 2017a). 시험결과에 따라 자극성을 분류하고, 농약, 원제 및 농약활용기자재의 표시기준 「농촌진흥청고시 제2017-27호」에서는 취급 시 주의사항 및 경고문구를 표기하도록 하고 있다(RDA, 2017b).

안점막 자극성을 평가하기 위해 드레이즈(Draize) 시험법(OECD TG 405)이 국제적으로 사용되어 왔다. 이 시험법은 토끼의 눈에 시험물질을 투여한 후 안구손상 반응 정도를 점수화하여 자극성을 판별하는 방법이다(OECD, 2017a). 드

*Corresponding author
E-mail: gurigoori@korea.kr

레이즈 시험법은 동물에게 많은 고통을 야기한다고 알려져 마취제와 진통제를 사용하고 한 마리에서 두 마리로 실험하는 순차적 시험전략을 포함하는 내용으로 개정되었고, 실험 동물 대신 도축 후의 닭 또는 소 안구, 토끼 각막세포를 이용하는 방법이 개발되었다(OECD, 2017a, 2017b, 2018a, 2018b). 또한 토끼의 눈은 사람보다 각막이 얇고, 눈물이 적으며 큰 결막낭과 순막을 가지는 등 생리학적, 해부학적으로 사람과 차이가 있고, 자극성 점수화 시 주관적 평가라는 드레이즈 시험법에 대한 한계점들이 제기되어 대체시험법이 개발되고 있다(Curren et al., 2002; OECD, 2018c; Schrage et al., 2011; Scott et al., 2010; Settivari, 2016; Wilson et al., 2015).

안점막자극은 시험물질이 각막 또는 결막에 침투하여 세포를 손상시킴으로써 발생된다. 특히 각막 상피조직은 가장 바깥쪽에 위치하기 때문에 자극성 물질로부터 직접적인 영향을 받게 된다. 따라서 각막 상피조직의 구조적 견고성이나 세포 생존율은 중요한 안자극성 지표로 사용되며, 이를 이용한 안점막자극성 동물대체시험법이 개발되었다(Jang et al., 2015; OECD, 2017b, 2018a, 2018b, 2018c; Settivari et al., 2016; Wilson et al., 2015). 대체법 중 하나로 3차원 인체각막상피모델은 인체표피자갈형성세포나 각막상피점막세포, 각막윤부상피세포 등을 배양하여 제작된다. 3차원 인체각막상피모델은 인체각막상피의 구조와 유사하게 층상구조와 고도로 분화된 편평상피를 갖고 사이토카인 등 생체지표물질(biomarker)을 분비할 수 있다(Jung et al., 2011; Kandarova et al., 2018; Lotz et al., 2016; Van Goethem et al., 2006; Wilson et al., 2015). 이러한 인체각막상피유사모델을 이용한 방법은 시험물질을 모델에 국소적으로 처리한 후 세포생존율을 측정하여 자극성을 분류하는 방법이다(OECD, 2018c). 국제적으로 EpiOcular™ (MatTek, USA), SkinEthic

HCE (SkinEthic, France), LabCyte CORNEA-MODEL 24 SIT (J-TEC, Japan)가 공인되었으며(OECD, 2018c), 현재 국내에서도 인체각막상피모델이 개발되어 시판되고 있다(Jang et al., 2015, Jung et al., 2011).

동물대체시험법은 주로 화장품 또는 화학물질 안전성 평가 분야에서 이용되어 왔으나 농약 독성 평가 분야에서도 급성독성 및 국소독성을 중심으로 적용을 확대하려고 하고 있다. 대표적으로 유럽, 호주, 뉴질랜드, 영국 등은 농약 등록을 위한 시험으로 대체시험법을 고시하거나 우선적으로 수행할 것을 권장하고 있다(APVMA, 2015; EU, 2009; NZ EPA, 2016; HSE, 2017a). 특히 영국의 농약담당관리기구인 보건안전청(HSE)은 안점막자극성시험에서의 토끼를 이용한 동물시험은 동물대체법으로 자극성 여부를 판정하기 어려울 때 당국과 협의하여 수행하도록 한다(HSE, 2017b). 또한 미국 EPA는 급성독성, 국소독성 분야에서 동물대체시험법을 확대할 계획이며, 항균제품(antimicrobial cleaning product)의 안점막자극성 평가에 적용하고 있는 동물대체시험법을 일반 농약으로도 확대하고자 동물대체시험법 결과와 동물실험 결과를 비교하는 파일럿 프로그램을 진행하고 있다(EPA, 2017).

국내에서는 각막혼탁 정도(degree), 각막혼탁 범위, 홍채 반응, 결막 부종, 발적, 분비물을 점수화하여 산출한 급성안점막자극지수(A.O.I.)를 기준으로 안점막자극성을 평가하고 있다(RDA, 2017a). US EPA 분류체계와 EU, 호주 등이 사용하는 UN GHS 분류체계에서는 관찰 시간이나 산출에 이용되는 동물 수에서 차이가 있지만 급성안점막자극지수 대신 시간에 따른 안자극의 손상 경과, 가역성을 가지고 자극성을 분류하고 있다(Table 1)(EPA, 2004; Kolle et al., 2015).

농약 제품을 이용한 대체법 적용 연구는 많지 않으며, 안점막자극성을 구분하는 기준 및 이에 따른 독성구분이 국가

Table 1. RDA, US EPA, and UN GHS classification criteria for ocular irritation

RDA	US EPA	UN GHS
Non irritation A.O.I. ≤ 10	Category IV Minimal effects clearing in less than 24 hours	No category Minimal effects
Mild irritation 10.1 ≤ A.O.I. ≤ 30.0	Category III (Caution) Corneal opacity ≥ 1 and/or iritis ≥ 1 and/or conjunctival redness ≥ 2 and/or chemosis ≥ 2 ^{a)} clearing in 7days or less	Category 2B (Warning) Corneal opacity ≥ 1 and/or iritis ≥ 1 and/or conjunctival redness ≥ 2 and/or chemosis ≥ 2 ^{b)} reversible 7 days
Moderate irritation 30.1 ≤ A.O.I. ≤ 60.0	Category II (Warning) Corneal opacity ≥ 1 and/or iritis ≥ 1 and/or conjunctival redness ≥ 2 and/or chemosis ≥ 2 ^{a)} clearing in 8-21 days	Category 2A (Warning) Corneal opacity ≥ 1 and/or iritis ≥ 1 and/or conjunctival redness ≥ 2 and/or chemosis ≥ 2 ^{b)} reversible 21 days
Severe irritation A.O.I. ≥ 60.1	Category I (Danger) Corrosive (irreversible destruction of ocular tissue) or corneal involvement or irritation persisting for more than 21 days	Category 1 (Danger) Corrosive (irreversible destruction of ocular tissue) or corneal involvement or irritation persisting (corneal opacity ≥ 3.0 and/or iritis ≥ 1.5) ^{b)} for more than 21 days

^{a)} Maximum score in any animal.

^{b)} Mean score at 24, 48, 72 hours after instillation of the test material in at least two animals.

별로 상이하므로 본 연구에서는 국내 등록 농약 28종과 인체각막상피유사모델 EpiOcular™과 MCTT HCE™ (MCTT, Korea)을 이용하여 안점막자극성 동물대체시험법이 국내 농약의 자극성 평가에 적용 가능한지 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

시험물질

본 연구에서 사용된 농약은 등록된 농약 제품으로 기존 토끼를 이용한 안점막자극성 시험에서 급성안점막자극지수 (A.O.I.)에 따라 자극성 정도를 고려하여 임의로 선발하였다. 유사한 원리를 이용한 인체피부모델 피부자극성 시험결과에서 중도이상의 농약 *in vivo* 시험과 *in vitro* 시험 결과간의 유사성이 관찰되었으므로(Jeong et al., 2012) 안점막 비자극성, 경도 품목 위주로 각각 10, 13 품목을 선정하였고 중도 4품목, 강도 1품목을 사용하였다(Table 2). 또한 농약관리법 또는 GHS 분류체계에 따라 안점막자극성을 분류하여 대체법 결과와 비교하였다.

인체각막유사상피모델(RhCE, Reconstructed Human Cornea-like Epithelium model)을 이용한 안점막 자극성 시험

EpiOcular™모델(MatTek, USA)을 이용하여 Kaluzhny 등 (Kaluzhny et al., 2011)이 보고한 방법 및 OECD 시험 지침서 492에 따라 안점막자극성 시험을 수행하였다. 시험물질 당 최소 2개의 인체각막상피모델을 사용하였고 음성대조물질로는 멸균수, 양성대조물질로는 메칠아세테이트 원액 (neat methyl acetate; CAS No. 79-20-9; Sigma-Aldrich)을

사용하였다. 인체각막유사상피모델의 안정화를 위해 well 당 1 mL의 assay media가 들어 있는 6-well plate에 옮겨 22 ± 2시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 전(前)배양 하였다. 물질을 처리하기 전에는 사람의 촉촉한 눈 상태와 유사하게 만들고자 모델 표면 위에 DPBS(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline; Sigma, USA) 20 µL로 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 30분 동안 전처리하였다. 각막상피모델 위에 액상 시험물질 50 µL를 고르게 처리한 뒤, 30분 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 반응시켰다. 반응 후 각각 인체각막유사상피모델을 300 mL DPBS를 시험물질을 세척하고 세척한 모델은 상온에서 12 ± 2분 동안 새 배지에 침지하여 시험물질을 충분히 제거하였다. 이후 well 당 1 mL의 assay media가 들어있는 6-well plate에 옮겨 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 2 시간동안 후(後)배양 하였다.

고상의 시험물질의 경우, PBS 20 µL로 표면을 적신 후 고상 시험물질 50 mg을 처리하였다. 6시간 동안 표준 세포 배양조건에서 배양한 후, 각각 인체각막상피모델은 DPBS 300 mL을 이용해 시험물질을 세척하였다. 세척 마지막 단계에서 멸균된 swab을 이용하여 DPBS를 제거하였다. 세척한 모델은 상온에서 25 ± 2분 동안 새 배지에 침지하여 시험물질을 충분히 제거하고 well 당 1 mL의 assay media가 들어 있는 6-well plate에 옮겨 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 18시간 동안 후(後)배양 하였다.

국내 개발모델인 HCE™ (MCTT, Korea)는 Jang 등(Jang et al., 2015)이 보고한 방법에 따라 수행하였다. 음성대조물질로 DPBS, 양성대조물질로 2% SDS (Sodium dodecyl sulfate; CAS No. 151-21-3, Bio-Rad, USA)를 사용하였다. EpiOcular™와 달리 액상시험물질은 40 µL를 10분 동안, 고

Table 2. Pesticides used in this study

Agrochemical formulations ^{a)}	
Cyazofamid·Valifenalate SC	Fentrazamide·Metazosulfuron GR
Fluazinam·Acetamiprid GR	Azoxystrobin·Dimethomorph WG
Oxaziclomefone·Tefuryltrione SC	Dithianon·Fluxapyroxad SC
Benzobicyclon·Imazosulfuron·Ipfencarbazone SC	Glufosinate-P SL
Pyribencarb SC	Lambda-cyhalothrin·Sulfoxaflor SL
Metazosulfuron WP	Prochloraz·Trifluzamide EC
Dimethoate GR	Bentazone·Propanil ME
Benzobicyclon·Mefenacet·Propyrisulfuron SC	Imicyafos SL
Ferimzone·Validamycin A SC	Emamectinbenzoate EC
Oxaziclomefone·Tefuryltrione GR	Dimethyl disulfide EC
Bromobutide·Imazosulfuron·Pyraclozil GR	Tetraconazole·Thifluzamide EC
Pyrifluquinazon SC	Glufosinate-ammonium SL
Chlorfluazuron·Indoxacarb SC	Flutolanil·Hymexazol WP
Dinotefuran·Spinetoram WG	Amisulbrom·Chlorothalonil SC

^{a)} EC, Emulsifiable concentrate; GR, Granule; ME, Micro-emulsion; SC, Suspension concentrate; SL, Soluble concentrate; WG, Water dispersible granule; WP, Wettable powder

Table 3. Acceptance criteria of *in vitro* eye irritation tests

Model	Criteria	Value
EpiOcular™	Negative control OD values	0.8 < OD ₅₇₀ < 2.5
	Viability of Positive control	Viability < 50%
	Standard deviation	< 20%
HCE™	Negative control OD values	1.6 ≤ OD ₄₅₀ ≤ 3.0
	Viability of Positive control	Viability ≤ 35%
	Standard deviation	< 20%

Table 4. Evaluation criteria of two alternatives to animal testing

	Evaluation	
	Irritation	Non-irritation
EpiOcular™	Viability ≤ 60%	Viability > 60%
HCE™	Viability ≤ 45%	Viability > 45%

상시험물질은 PBS 40 µL로 표면을 적신 후 시험물질 40 mg을 3시간 동안 세포배양 조건에서 처리하였다. 물질처리 후 액체처리군은 28 mL DPBS, 고체 처리군은 70 mL DPBS를 이용하여 시험물질을 제거하였다. 이후 16시간 동안 세포배양을 수행하였다.

세포생존율 측정 시험

후(後)배양이 끝난 후 인체각막유사상피모델의 생존율을 측정하기 위해 MTT (3-(4, 5-dimethyl thiazole 2-yl) 2,5-diphenyltetrazolium bromide; CAS No. 298-93-1, Sigma) assay를 실시하였다. 인체각막유사상피모델에 묻어 있는 배지 등의 잔류액을 DPBS와 멸균된 swab으로 제거하였다. 모델을 24-well plate에 옮긴 후 0.3 mg/mL MTT를 300 µL씩 처리하여 3시간 동안 세포 배양 조건에서 배양하였다. 배양 후 MTT를 DPBS와 swab으로 제거하고 모델을 새로운 24-well plate에 옮겨 isopropyl alcohol (CAS No. 67-63-0, Sigma)을 2 mL씩 처리하였다. 처리 후 2시간 동안 상온에서 교반하면서 formazan을 추출하였다. 추출한 시료는 200 µL씩 96-well plate에 옮겨 multiskan spectrum (Thermo, USA)을 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

국내 모델의 경우 WST-1 (Roche, Germany) assay를 이용하여 세포생존율을 측정하였다. 희석된 WST-1 용액을 모델에 분주하고 세포배양조건에서 3시간 배양하여 formazan을 추출한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

각 모델별로 시험의 적정성(Table 3)을 판정하였고, 분류 기준에 따라 자극성 물질을 판정하였다(Table 4).

대체시험법 자극성 예측력 평가

민감도(Sensitivity), 특이도(Specificity), 정확도(Accuracy)를 산출하여 동물을 이용한 기존 체내(*in vivo*) 시험과 인체각막유사상피모델을 이용한 체외(*in vitro*) 시험의 자극성 분

류의 유사정도를 평가하였다. 민감도는 체내(*in vivo*) 시험에서 자극성으로 분류된 물질을 체외(*in vitro*) 시험에서도 자극성으로 정확하게 분류하는 비율(%), 특이도는 비자극성 물질을 체외(*in vitro*) 시험에서 비자극성으로 분류하는 비율(%), 정확도는 체내 시험 물질 분류와 체외 시험 물질 분류가 동일하게 판정되는 비율(%)을 의미한다.

- Sensitivity (%) = [True Positive / (True Positive + False Negative)] * 100
- Specificity (%) = [True Negative / (True Negative + False Positive)] * 100
- Accuracy (%) = [(True Positive + True Negative) / Tested Materials] * 100

결과 및 고찰

시험물질

농촌진흥청에 제출된 안점막자극성 시험성적서를 바탕으로 등록 농약 28종에 대해 안점막자극성을 분류하였다(Table 5). 토끼를 이용한 시험에서의 급성안점막자극지수(A.O.I.)를 이용하여 농약관리법 기준에 따라 자극성을 분류하였고, 눈 손상 회복가능 여부, 각막, 홍채 또는 결막의 영향을 이용하여 GHS 분류 기준에 따라 GHS 물질 구분을 하였다. You 등(You et al., 2016)이 발표한 연구결과와 유사하게 농촌진흥청 기준으로 경도를 나타내는 13품목 중 10품목(76.9%)이 분류되지 않음(unclassified)로 분류되었다. 또한 중도를 나타내는 3품목에서 비가역적인 반응이 나타나 심한 눈 손상 물질(GHS Cat 1)로 분류되었다.

농약관리법 자극성 분류체계에 따른 체내(*in vivo*) 시험과 체외(*in vitro*) 시험의 자극성 구분 비교

EpiOcular™ 모델을 이용한 시험에서는 농약관리법에 따라 비자극성 농약으로 분류된 10품목 중에서 5품목이 비자극성으로 분류되었다. 경도 이상의 자극성 농약에서는 18품목 모두 자극성 물질로 예측되었다.

국내 HCE™ 모델을 이용하여 안점막자극성을 평가한 결과, 비자극성 농약 10품목 중 7품목이 비자극성으로 분류되

Table 5. Pesticides used in this study

Agrochemical formulations ^{a)}	A.O.I. ^{b)}	Classification	
		Korean system ^{c)}	GHS system
Cyazofamid·Valifenalate SC	0	NI	Unclassified
Fluazinam·Acetamiprid GR	0	NI	Unclassified
Oxaziclomefone·Tefuryltrione SC	0	NI	Unclassified
Benzobicyclon·Imazosulfuron·Ipfencarbazone SC	2	NI	Unclassified
Pyribencarb SC	3.3	NI	Unclassified
Metazosulfuron WP	6	NI	Unclassified
Dimethoate GR	8	NI	Unclassified
Benzobicyclon·Mefenacet·Propyrisulfuron SC	8.7	NI	Unclassified
Ferimzone·Validamycin A SC	8.7	NI	Unclassified
Oxaziclomefone·Tefuryltrione GR	9.3	NI	Unclassified
Bromobutide·Imazosulfuron·Pyraclozil GR	11.3	MI	Unclassified
Pyrifluquinazon SC	11.3	MI	Unclassified
Chlorfluazuron·Indoxacarb SC	12	MI	Unclassified
Dinotefuran·Spinetoram WG	12	MI	Unclassified
Fentrazamide·Metazosulfuron GR	12	MI	Unclassified
Azoxystrobin·Dimethomorph WG	13.3	MI	Unclassified
Dithianon·Fluxapyroxad SC	13.3	MI	Unclassified
Glufosinate-P SL	14	MI	Unclassified
Lambda-cyhalothrin·Sulfoxaflo SL	14	MI	GHS Cat 2B
Prochloraz·Trifluzamide EC	14	MI	GHS Cat 2A
Bentazone·Propanil ME	14.7	MI	Unclassified
Imicyafos SL	14.7	MI	Unclassified
Emamectinbenzoate EC	19.7	MI	GHS Cat 2A
Dimethyl disulfide EC	37	MO	GHS Cat 2A
Tetraconazole·Thifluzamide EC	39.3	MO	GHS Cat 1
Glufosinate-ammonium SL	46	MO	GHS Cat 1
Flutolanil·Hymexazol WP	47	MO	GHS Cat 1
Amisulbrom·Chlorothalonil SC	110	SI	GHS Cat 1

^{a)} EC, Emulsifiable concentrate; GR, Granule; ME, Micro-emulsion; SC, Suspension concentrate; SL, Soluble concentrate; WG, Water dispersible granule; WP, Wetttable powder

^{b)} Acute ocular irritation index

^{c)} NI, Non irritation; MI, Mild irritation; MO, Moderate irritation; SI, Severe irritation

었다. 하지만 공인 모델인 EpiOcular™와 달리 경도 2품목, 중도 1품목에서 비자극성물질로 분류되어 위음성 결과를 보였다(Table 6). 공인 모델은 인체표피각질형성세포 이용하여 제작되었고 국내 모델은 인체각막윤부상피세포를 배양하여 제작되었는데, 서로 다른 기원의 세포를 이용하여 모델을 제작하는 것은 세포 행동(behavior)이나 생체 지표(Bio-marker) 발현 등의 차이를 줄 수 있다고 알려졌다(Lotz et al., 2015). 따라서 공인모델과 국내모델의 자극성 예측의 차이는 자극성 판정기준 및 시험물질 처리 양, 처리 시간 등 시험방법이 상이할 뿐만 아니라 두 모델간의 구조적 또는 생리 기능적 차이에 기인한 것이라 사료되었다.

GHS 자극성 분류체계에 따른 체내(*in vivo*) 시험과 체외(*in vitro*) 시험의 자극성 구분 비교

공인 모델을 이용한 시험에서는 GHS 분류되지않음(Unclassified) 20품목 중 5품목만 비자극성으로 분류되고 모두 자극성으로 분류되었다. GHS Cat 2 (자극성) 또는 GHS Cat 1 (심한 눈 손상성)으로 분류된 물질은 모두 자극성으로 분류되었다. 국내 모델 HCE™를 이용한 실험에서는 GHS 분류되지않음(Unclassified) 품목에서 9품목이 비자극성으로 분류되었고 심한 눈 손상성을 나타내는 1품목에서 비자극성으로 분류되었다(Table 6).

Table 6. Cell viability of reconstituted human corneal epithelium (RhCE) models and in vitro classification

Agrochemical formulations	in vivo		in vitro RhCE models			
	Korean ^{a)}	UN GHS	EpiOcular™		HCE™	
			viability (%), evaluation ^{b)}		viability (%), evaluation ^{b)}	
Cyazofamid·Valifenalate SC	NI	Unclassified	91.3 ± 2.91	NI	79.4 ± 0.19	NI
Fluazinam·Acetamiprid GR	NI	Unclassified	88.8 ± 2.36	NI	89.3 ± 1.68	NI
Oxaziclomefone·Tefuryltrione SC	NI	Unclassified	61.9 ± 4.62	NI	64.6 ± 1.51	NI
Benzobicyclon·Imazosulfuron·Ipfencarbazone SC	NI	Unclassified	101.0 ± 2.76	NI	94.2 ± 4.08	NI
Pyribencarb SC	NI	Unclassified	89.3 ± 2.64	NI	78.6 ± 1.98	NI
Metazosulfuron WP	NI	Unclassified	3.0 ± 0.28	I	14.5 ± 1.25	I
Dimethoate GR	NI	Unclassified	4.0 ± 1.93	I	6.4 ± 0.75	I
Benzobicyclon·Mefenacet·Propyrisulfuron SC	NI	Unclassified	54.9 ± 4.91	I	64.7 ± 2.34	NI
Ferimzone·Validamycin A SC	NI	Unclassified	35.0 ± 4.37	I	52.7 ± 4.54	NI
Oxaziclomefone·Tefuryltrione GR	NI	Unclassified	2.3 ± 0.08	I	1.5 ± 0.7	I
Bromobutide·Imazosulfuron·Pyraclopi GR	MI	Unclassified	12.1 ± 1.67	I	41.2 ± 7.12	I
Pyriproquinazone SC	MI	Unclassified	9.5 ± 0.18	I	8.5 ± 0.67	I
Chlorfluazuron·Indoxacarb SC	MI	Unclassified	16.4 ± 1.75	I	9.4 ± 0.79	I
Dinotefuran·Spinetoram WG	MI	Unclassified	2.2 ± 0.32	I	18.9 ± 7.34	I
Fentrazamide·Metazosulfuron GR	MI	Unclassified	2.9 ± 0.13	I	22.3 ± 7.00	I
Azoxystrobin·Dimethomorph WG	MI	Unclassified	1.7 ± 0.11	I	17.0 ± 0.55	I
Dithianon·Fluxapyroxad SC	MI	Unclassified	40.0 ± 11.86	I	78.7 ± 2.44	NI
Glufosinate-P SL	MI	Unclassified	5.4 ± 0.34	I	86.1 ± 6.52	NI
Lambda-cyhalothrin·Sulfoxaflor SL	MI	GHS Cat 2B	11.2 ± 0.82	I	11.1 ± 0.78	I
Prochloraz·Trifluzamide EC	MI	GHS Cat 2A	9.1 ± 3.42	I	3.2 ± 0.38	I
Bentazone·Propanil ME	MI	Unclassified	8.6 ± 1.3	I	4.5 ± 0.84	I
Imicyafos SL	MI	Unclassified	5.3 ± 0.30	I	11.5 ± 3.22	I
Emamectinbenzoate EC	MI	GHS Cat 2A	5.7 ± 0.13	I	1.2 ± 0.36	I
Dimethyl disulfide EC	MO	GHS Cat 2A	10.1 ± 2.93	I	2.7 ± 0.46	I
Tetraconazole·Thiifluzamide EC	MO	GHS Cat 1	11.7 ± 0.29	I	39.3 ± 0.24	I
Glufosinate-ammonium SL	MO	GHS Cat 1	7.7 ± 1.38	I	91.5 ± 1.73	NI
Flutolanil·Hymexazol WP	MO	GHS Cat 1	2.0 ± 0.17	I	1.1 ± 0.34	I
Amisulbrom·Chlorothalonil SC	SI	GHS Cat 1	10.1 ± 0.15	I	7.1 ± 0.31	I

^{a)} NI, Non irritation; MI, Mild irritation; MO, Moderate irritation; SI, Severe irritation

^{b)} NI, Non irritation; I, irritation

대체시험법 자극성 예측력 평가

동물을 이용한 자극성 시험결과와 인체각막상피유사모델을 이용한 시험결과를 비교하여 대체법의 안점막자극성 예측 정도를 평가하였다(Table 7). 농약관리법에 따른 체내(*in vivo*) 분류 결과와 비교 시, EpiOcular™ 모델의 민감도(Sensitivity)는 100%, 특이도(Specificity)는 50%, 정확도(Accuracy)는 82.1%로 산출되었다. HCE™ 모델의 민감도는 83.3%, 특이도는 70%로 EpiOcular™ 모델과 비교 시, HCE™ 모델은 비자극성물질을 효과적으로 분류하나 자극성 물질 예측력을 개선할 필요가 있었다. HCE™ 모델을 이용한 안점막자극성 시험에서 자극성 또는 비자극성을 구분하는 기준(cutoff)에 대한 연구가 수행되었다(Jang et al.,

2015; Yang et al., 2017). cutoff를 50%로 하였을 때, 정확도 차이는 나지 않았으나 cutoff를 35%로 하고 농약관리법을 기준으로 분류하였을 때, 민감도는 72%, 정확도는 71%로 오히려 감소하였다. cutoff 이외에도 노출 시간, 물질 처리 양 등 다양한 조건을 검토하여 자극성 예측력을 높일 필요가 있었다.

GHS 분류에 따라 농약의 자극성을 구분하였을 때, 특이도가 25-45%로 두 모델 모두 분류되지않음(unclassified) 물질을 구분하기 어려워 정확도가 감소한 것을 확인할 수 있었다. 본 연구의 결과로 GHS 분류체계와 농약관리법 분류체계 비교 시, 특이도를 향상시킬 수 있도록 시험법을 개선할 필요가 있으나 각막상피유사모델을 이용한 농약의 안점

Table 7. Performance of RhCE test method for predicting eye irritation potential of pesticides

		<i>in vitro</i> RhCE test	
		EpiOcular™	HCE™
Korean classification system	Sensitivity %	100.0 (18/18)	83.3 (15/18)
	Specificity %	50.0 (5/10)	70.0 (7/10)
	Accuracy %	82.1 (23/28)	78.6 (22/28)
GHS classification system	Sensitivity %	100 (8/8)	87.5 (7/8)
	Specificity %	25 (5/20)	45 (9/20)
	Accuracy %	46.4 (13/28)	57.1 (16/28)

Sensitivity, % of irritants correctly predicted in vitro test

Specificity, % of non-irritants correctly predicted in vitro test

Accuracy, % of pesticides correctly classified

막자극성 평가에서는 농약관리법에 따른 자극성 분류가 더 적합하다고 판단되었다(Table 7).

궁극적으로 대체법 시험에서의 민감도와 특이도를 높이는 것이 중요하지만, 특히 중요한 것은 위음성율을 줄여 안전성을 확보하는 것이다(Settivari et al., 2016). 또한 3차원 인체모델은 위음성율이 적어 자극성 예측이 용이하나 특이도가 떨어진다고 알려져 있다(Lotz et al., 2015). 본 연구에서도 이와 유사하게 두 인체각막상피유사모델을 이용한 자극성 시험에서, 83.3% 이상의 민감도를 보이며, 특히 자극성 농약 평가에 있어서 체내(*in vivo*) 시험과 체외(*in vitro*) 시험과의 유사성이 높은 것으로 나타나 모델을 이용하였을 때 자극성물질 평가가 가능한 것으로 판단하였다.

국제적으로 공인된 시험법 대부분은 단일물질을 이용하여 시험법을 검증하고 있다. 하지만 농약은 하나 이상의 유효 성분(active substance)과 제형(formulation)을 위해 투입되는 부자재로 이루어진 복합물이며 사용 전 회석과정을 요구하는 고농도 제형으로 만들어지기도 한다. 이러한 농약의 특징들은 삼투압농도, 표면장력에 영향을 줄 수 있으며, 다양한 부자재들이 투입되면서 단일 물질과 다르게 동물 대체법을 적용하는데 있어 어려움이 있을 수 있다(Settivari et al., 2016). 농약 제품과 같은 복합물질은 단일물질과 특성이 다르므로 토끼를 이용한 안점막자극성 시험을 대체하기 위해 복합물질에 대한 시험법이 개선, 개발이 필요하다. 또한 하나의 대체시험법으로 안점막자극성을 평가하기에 충분하지 않다고 알려져 있다(Fowle et al., 2012; Scott et al., 2010). 농약 제품에 대해서도 안점막자극성 대체법을 적용하고 있는 영국의 경우는 대체시험법 한 가지 방법으로만 자극성을 평가하지 않고 있다. 다양한 대체법을 복합적으로 이용하고 필요 시 당국과 상의 하에 동물실험까지도 수행하여 안점막자극성을 평가하도록 하고 있다(HSE, 2017b). 국내에서는 자극성/부식성 정도에 따라 주의사항 문구를 달리 하고 강도의 자극성 농약에 대해서는 등록이 보류되므로 소각막을 이용한 방법 등 안점막부식성을 확인 할 수 있는 통합적인 시험 전략 (integrated approach) 마련이 필요하다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업 (과제번호: PJ011784)의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

Literature Cited

- APVMA (2015) Data guidelines, Part 3. Toxicol. Version 2 (4). June 2015. <http://apvma.gov.au/node/1036>. Accessed 29 June 2018.
- Curren, R. D., and J. W. Harbell (2002) Ocular safety: a silent (in vitro) success story. *Altern Lab Anim.* 30 Supple 2:69-74.
- EPA (2004) Chemical hazard classification and labeling: Comparison of OPP requirements and the GHS. <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/ghscriteria-summary.pdf>. Accessed 17 September 2018
- EPA (2017) OPP progress on acute animal testing alternatives. PPDC meeting session 5. <https://www.epa.gov/sites/production/files/2017-10/documents/session-5-acute-animal-testing-alternatives.pdf>. Accessed 29 July 2018.
- EU (2009) European Union (EU). Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 Concerning the Placing of Plant Protection Products on the Market. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R1107&from=EN>. Accessed 27 June 2018.
- Fowle, J. R. III, J. C. Redden, T. F. McMahon and R. D. Curren (2012) Development of a non-animal testing strategy for ocular hazard labeling of some specific EPA-regulated products. *ALTEX Archive*, WC8:133-138.
- HSE (2017a) HSE Pesticides EBulletin (Regulatory Update:03/2017): Vertebrate Data Used for Pesticide Authorisations, Epub:25 January 2017. <https://content.govdelivery.com/accounts/UKHSE/bulletins/1812d0f>. Accessed 6 April 2018.
- HSE (2017b) Introduction to the Regulation of Pesticides: Vertebrate Testing Requirements <https://www.hse.gov.uk/>

- pesticides/topics/pesticide-approvals/pesticides/-registration/applicant-guide/vertebrate-testing.htm. Accessed 6 April 2018.
- Jang, W. H., K. M. Jung, H. R. Yang, M. Lee, H. S. Jung, S. H. Lee, M. Park and K. M. Lim (2015) Evaluation of eye irritation potential of solid substance with new 3D reconstructed human cornea model, MCTT HCE™. *Biomol Ther.* 23(4):379-85.
- Jeong, M., M. K. Kim, S. J. Park, A. S. You, S. S. Hong, K. H. Park and J. E. Park (2012) The application of alternative methods for skin irritation evaluation on pesticides. *Korean J. Pestic. Sci.* 16(3):261-266.
- Jung, K. M., S. H. Lee, Y. H. Rye, W. H. Jang, H. S. Jung, J. H. Han, S. H. Seok, J. H. Park, Y. Son, Y. H. Park and K. M. Lim (2011) A new 3D reconstructed human corneal epithelium model as an alternative method for the eye irritation test. *Toxicol in vitro.* 25(1):403-410.
- Kaluzhny, Y., H. Kandárová, P. Hayden, J. Kubilus, L. d'Argembeau-Thornton and M. Klausner. (2011) Development of the EpiOcular™ eye irritation test for hazard identification and labelling of eye irritating chemicals in response to the requirements of the EU cosmetics directive and REACH legislation. *Altern Lab Anim.* 39(4):339-64.
- Kandarova, H., S. Letasiova, E. Adriaens, R. Guest, J. A. Willoughby Sr, A. Drzewiecka, K. Gruszka, N. Alepee, S. Verstraelen and An R. Van Rompay (2018) CON4EI: EpiOcular™ Eye Irritation Test (EpiOcular™ EIT) for hazard identification and labelling of eye irritating chemicals. *Toxicol in vitro.* 49:21-33.
- Kolle S. N., M. C. Rey Moreno, W. Mayer, A. van Cott, B. van Ravenzwaay and R. Landsiedel (2015) The EpiOcular™ eye irritation test is the method of choice for the *in vitro* eye irritation testing of agrochemical formulations: Correlation analysis of EpiOcular eye irritation test and BCOP test data according to the UN GHS, US EPA and Brazil ANVISA classification schemes. *Altern Lab Anim.* 43(3):181-98.
- Lotz, C., F. F. Schmid, A. Rossi, S. Kurdyn, D. Kampik, B. De Wever, H. Walles and F. K. Groeber (2016) Alternative methods for the replacement of eye irritation testing. *ALTEX.* 33(1):55-67.
- MatTek Corporation (2015) EpiOcular™ eye irritation test (OCL-200-EIT) for the prediction of acute ocular irritation of chemicals. <https://www.mattek.com/wp-content/uploads/EpiOcular-Eye-Irritation-Test-EIT.pdf>. Accessed 13 September 2018.
- NZ EPA (2016) New Zealand Environmental Protection Agency, Data Requirements for Chemical Pesticides; Checklist and File Index for HS Application. November 2016. http://www.epa.govt.nz/hazardous-substances/approvals/Pages/data_reqs.aspx. Accessed 6 April 2018.
- OECD (2017a) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals Test No. 405: Acute eye irritation/corrosion. <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264185333-en.pdf?expires=1536626470&id=id&accname=guest&checksum=F14101DF3462E57ED3DE10713E6B2025>. Accessed 11 September 2018.
- OECD (2017b) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals Test No. 437: Bovine corneal opacity and permeability test method for i) identifying chemicals inducing serious eye damage and ii) chemicals not requiring classification for eye irritation or severe eye damage. <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264203846-en.pdf?expires=1533629862&id=id&accname=guest&checksum=F92C046625F53D9F3C24D123C281AAF1>. Accessed 27 June 2018.
- OECD (2018a) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals Test No. 438: Isolated chicken eye test method for identifying i) chemicals inducing serious eye damage and ii) chemicals not requiring classification for eye irritation or severe eye damage. <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264203860-en.pdf?expires=1533629922&id=id&accname=guest&checksum=BF7B0B36A7463CD5DD257E8C5F1EA333>. Accessed 29 June 2018.
- OECD (2018b) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals Test No. 491: Short time exposure *in vitro* test method for identifying i) chemicals inducing serious eye damage and ii) chemicals not requiring classification for eye irritation or severe eye damage. <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264242432-en.pdf?expires=1533629949&id=id&accname=guest&checksum=81C3CEF57666069F6B42045BC4263865>. Accessed 29 June 2018.
- OECD (2018c) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals Test No. 492: Reconstructed human like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or severe eye damage. <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264242548-en.pdf?expires=1533629984&id=id&accname=guest&checksum=F6ADC4A0B3588F29F1199F1531128D67>. Accessed 30 June 2018.
- RDA (2017a) Criteria for Registration of Pesticides and Active substances, Legislation and Notification Directive for pesticide regulation, RDA, p212-214, 240.
- RDA (2017b) Labelling criteria for pesticides, active substances, and appliance with pesticides in legislation for pesticide regulation, Legislation and Notification Directive for pesticide regulation, RDA, p639-640.
- Schrage, A., S. N. Kolle, M. C. Moreno, K. Norman, H. Raabe, R. Curren, B. van Ravenzwaay and R. Landsiedel (2011) The bovine corneal opacity and permeability test in routine ocular irritation testing and its improvement withing the limits of OECD test guideline 437. *Altern Lab Anim.* 39(1):37-53.
- Scott, L., C. Eskes, S. Hoffmann, E. Adriaens, N. Alepee, M. Bufo, R. Clothier, D. Facchini, C. Faller, R. Guest, J. Harbell, T. Hartung, H. Kamp, B. Varlet, M. Meloni, P. McNamee, R. Osborne, W. Pape and V. Zuang (2010) A

- proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace in vivo studies using Bottom-Up and Top-Down approaches. *Toxicol In vitro*. 24(1):1-9.
- Settivari, R. S., R. A. Amado, M. Corvaro, N. R. Visconti, L. Kan, E. W. Carney, D. R. Boverhof and S. C. Gehen (2016) Tiered application of the neutral red release and EpiOcular™ assays for evaluating the eye irritation potential of agrochemical formulations. *Regul Toxicol Pharmacol*. 81:407-420.
- Van Goethem, F., E. Adriaens, N. Alepee, F. Straube, B. De Wever, M. Cappadoro, S. Catorie, E. Hansen, A. Wolf and P. Vanparys (2006) Prevalidation of a new in vitro reconstituted human cornea model to assess the eye irritating potential of chemicals. *Toxicol in vitro*. 20(1):1-17.
- Wilson, S. L., M. Ahearne and A. Hopkinson (2015) An overview of current techniques for ocular toxicity testing. *Toxicology*. 327(2):32-46.
- Yang, H., D. E. Kim, W. H. Jang, S. An, S. A. Cho, M. S. Jung, J. E. Lee, K. W. Yeo, S. B. Koh, T. C. Jeong, M. J. Kang, Y. J. Chun, S. H. Lee, K. M. Lim and S. J. Bae (2017) Prevalidation trial for a novel eye irritation test using the reconstructed human cornea-like epithelial model, MCTT HCE™. *Toxicol in vitro*. 39:58-67.
- You, A. S., J. A. Oh, S. Park, Y. Jo, J. B. Lee, N. Lee, J. Y. Lee and Y. Ihm (2016) Comparison of differences between the results of irritation classification after irritation calculation with GHS criteria and RDA Directives in plant protection products. *Korean J. Pestic. Sci*. 20(4):326-340.

인체각막상피유사모델을 이용한 농약의 안점막자극성 평가

조유미* · 이주연 · 박수진 · 유아선 · 오진아 · 이제봉 · 박연기¹ · 정미혜

국립농업과학원 농산물안전성부 농자재평가과, ¹국립식량과학원 작물기초기반과

요약 안점막자극성을 분류하기 위한 동물대체시험법들은 화장품, 화학물질 등 각 관련 규제기관에서 안전성을 확보하기 위해 사용되고 있다. 하지만 농약 제품을 이용한 동물대체법 연구는 거의 없으며, 국내에서 농약의 안점막 자극성은 GHS 분류체계가 아닌 농약관리법에 따라 분류하고 있다. 따라서 본 연구에서는 인체각막상피유사모델 (EpiOcular™, HCE™) 시험법이 농약관리법 분류 체계 또는 GHS 분류체계에 따라 농약의 안자극성을 예측할 수 있는지 조사하였다. 두 각막상피유사모델 EpiOcular™, HCE™에 28종의 농약을 각각 처리한 뒤 자극성평가지표로 세포 생존율을 측정하였다. 농약관리법 및 GHS 자극성 분류체계에 따라 체내(*in vivo*) 시험에서의 시험물질 자극성을 분류하였고 모델을 이용한 체외(*in vitro*) 시험의 자극성 결과와 비교하였다. 농약관리법, GHS에 따라 자극성을 분류한 결과와 비교하였을 때, 국제 공인 모델인 EpiOcular™ 모델은 각각 특이도 50%, 25%를 보였으나 민감도가 100% 이었다. EpiOcular™ 모델은 비자극성물질 예측력을 높여 특이도를 개선할 필요가 있었다. 국내 개발 모델인 HCE™ 모델의 특이도는 EpiOcular™ 모델의 특이도보다 높았지만 민감도가 상대적으로 감소하였다. 하지만 전반적으로 특이도와 민감도가 높기 때문에 자극성물질 예측력만 개선된다면 대체법 모델로 활용 될 수 있을 거라 판단되었다. 두 인체각막상피유사모델을 이용하여 농약의 자극성을 평가한 결과, GHS 분류시스템보다 농약관리법의 분류 기준에 더 적합하였다. 각막상피유사모델을 이용한 안점막자극성 시험은 자극성 물질 판별에 유용하였고, 다른 체내 혹은 체외 시험과 함께 일련의 시험 전략의 한 방법으로 사용 될 수 있을 거라 사료되었다.

색인어 농약, 동물대체시험, 인체각막상피유사모델, 안점막자극성