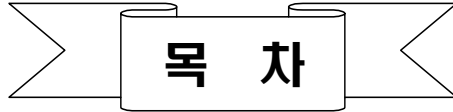


2010 의약외품 관련 가이드라인 모음집





목 차

- ◆ 황사방지용 및 방역용 마스크의 기준 규격에 대한 가이드라인 1
- ◆ 멸균 의약외품의 평가 가이드라인 19
- ◆ 전염병예방용 살충제 등의 효력시험 가이드라인 39
- ◆ 양모제 효력평가시험법 가이드라인 91

**황사방지용 및 방역용
마스크의 기준 규격에 대한
가이드라인**

호흡기를 질병의 감염, 악취, 매연으로부터 보호할 목적으로 위생상의 용도로 사용되는 마스크는 약사법에 따른 의약외품으로서 식품의약품안전청에서 품목별 심사 및 허가를 하고 있습니다. 지구 온난화로 인하여 황사의 발생이 잦아지고, 신종플루와 같은 유행성 전염병 등으로 실생활에서 마스크를 사용하는 경우가 늘고 있습니다. 이에 따라 국민의 건강증진과 관련 업계의 마스크 품질 향상에 도움을 주고자 본 가이드라인을 마련하였습니다.

본 가이드라인에서는 위생상의 용도로 사용되는 마스크를 분진포집효율 등의 마스크 기능에 따라 등급을 나누어 각 등급에 해당하는 구체적인 기준 및 시험방법을 제시하고 있습니다.

또한, 이 가이드라인은 현재까지의 경험과 과학적 사실에 근거한 것이므로 새로운 과학적 근거가 있을 경우 언제든지 개정될 수 있으며 이러한 사항이 있을 경우 식품의약품안전청에 의견을 제시하여 주시기 바랍니다.

※ 본 지침에 대한 의견이 있을 경우 식품의약품안전청
바이오생약국 화장품심사과로 문의하시기 바랍니다.

전화번호 02-380-1721~2

팩스번호 02-385-2154



I. 서 론	7
II. 마스크의 등급 및 기준	8
III. 누설률 시험법	9
IV. 마스크의 기준 및 시험방법	12

지구 온난화로 인하여 황사의 발생이 잦아지고, 신종플루와 같은 유행성 전염병 등으로 실생활에서 마스크를 사용하는 경우가 늘고 있다. 호흡기를 질병의 감염, 악취, 매연으로부터 보호할 목적으로 사용되는 마스크는 약사법에 따른 의약외품으로서 식품의약품안전청에서 품목별 심사 및 허가를 하고 있으며, 마스크의 종류로는 보건용 마스크, 수술용 마스크 외에도 황사 방지용 및 방역용 마스크가 있다. 이 중 황사 방지용 및 방역용 마스크의 경우 분진포집효율시험, 안면부 흡기저항시험, 누설률 시험 등의 시험을 통해 외부로부터 흡입되는 이물질질을 차단하는 정도를 측정하여 품목별 허가를 받아야 하며 소비자가 알기 쉽게 사용하기 위해서는 이에 따른 등급별 관리가 필요하다.

이 가이드라인은 황사 방지용 및 방역용 마스크의 품질관리를 위한 분진포집효율시험, 안면부 흡기저항시험 및 누설률 시험의 표준화된 시험법을 제시하고 이를 품질관리에 적용함으로써 공기중 이물질 흡입에 따른 인체 위해를 방지하고 국민 건강 증진에 기여하고자 하는 것이다.

II

마스크의 등급 및 기준

등 급	기 준			적용예
	분진포집효율	안면부흡기저항	누설률	
KF80	80 % 이상 (염화나트륨 시험)	6.2 mmH ₂ O 이하	25 % 이하	황사방지용
KF94	94 % 이상 (염화나트륨 및 파라핀 오일 시험)	7.2 mmH ₂ O 이하	11 % 이하	방역용
KF99	99.0 % 이상 (염화나트륨 및 파라핀 오일 시험)	10.3 mmH ₂ O 이하	5 % 이하	-

Ⅲ

누설률 시험법

피시험자로 깨끗하게 면도한 10 명(턱수염이나 구레나룻이 없는)을 선정하고, 피시험자 10 명이 3 번씩 시험한 결과에 따라 등급별로 누설률을 구한다.

(가) 본 품 10 개를 가지고 5 개는 제품 그대로, 나머지 5 개는 미리 온도 38 ± 2.5 °C, 습도 85 ± 5 %RH에서 24 ± 1 시간 동안 방치한 것을 시험용 검체로 사용한다.

(나) 염화나트륨 시약을 증류수에 용해시켜 2 % 염화나트륨용액을 만든 후 자동필터 검사장비를 이용하여 염화나트륨 에어로졸을 발생시킨다.

(다) 챔버내에 들어가는 평균 염화나트륨 에어로졸의 농도는 8 ± 4 mg/m³로 한다. 이 때 입경 분포는 $0.02 \mu\text{m} \sim 2 \mu\text{m}$ 이며, 평균 입경은 약 $0.6 \mu\text{m}$ 이다.

(라) 안면부 내부 및 챔버내의 염화나트륨 에어로졸의 농도는 자동필터 검사장비를 이용하여 측정한다.

(마) 가능한 한 염화나트륨 에어로졸이 챔버의 꼭대기로 들어가도록 하고, 그 속도는 최소한 초당 0.12 m의 속도로 피시험자의 머리 위로 직접 흘러내리도록 한다. 염화나트륨 에어로졸의 농도는 균일해야 하고, 속도는 피시험자 머리의 가까운 위치에서 측정되어야 한다.

(바) 수동런닝 머신 : 6 km/h에서 작동할 수 있는 수준

(사) 시험용 검체 시뮬레이터 : 피험자의 안면부와 시험용 검체의 연

결 부분에는 시뮬레이터가 사용되며 초경량 연결호스에 의하여 청정공기가 공급되도록 하여야 한다. 안면부에 부착되는 청정공기 호스는 안면부 장착 후에 영향을 주지 않아야 하며, 필요하다면 호스를 고정시켜야 한다. 시험용 검체 시뮬레이터는 그 무게가 500 g이어야하고, 호스의 압력강하는 분당 95L의 유량에서 100 mmH₂O이어야하며, 이 때 압력강하는 호스의 부위에 관계없이 균일하게 분포되어야 한다.

- (아) 챔버내에 시험공기가 들어가지 않는지 확인한 후 피시험자를 들어가도록 하고 안면부 내부의 염화나트륨 에어로졸 농도를 측정할 수 있도록 연결관을 연결한다. 피시험자를 시간당 6 km의 속도로 2 분 동안 걷게 한다. 보정값을 얻기 위하여 안면부 내부의 염화나트륨 에어로졸 농도를 측정한다. 안정된 농도를 얻으면 시험 공기를 공급한다.
- (자) 다음 운동을 피시험자가 계속 걸으면서 실시하여야 한다
- ㉠ 머리를 움직이거나 말하지 않고 2분 동안 걷는다.
 - ㉡ 터널의 벽면을 조사하는 것처럼 머리를 좌우로 약 2 분 동안 15 번 정도 움직인다
 - ㉢ 지붕과 바닥을 조사하는 것처럼 머리를 위 아래로 약 2 분 동안 15 번 정도 움직인다
 - ㉣ 2 분 동안 가나다라마 문장을 큰소리로 말한다.
 - ㉤ 머리를 움직이거나 말하지 않고 2분 동안 걷는다.
- (차) 시험 공기의 공급을 중단하고 염화나트륨 에어로졸을 챔버로부터 환기시킨 후 시험자를 나오게 한다.
- (카) 시험 후 다음 두 번째 누설률 시험을 하기 위하여 안면부를 사용하기 에 건조시키고, 소독하고, 청결하게 유지시켜야 한다.
- (타) 계 산

$$P(\%) = \frac{C_2}{C_1} \times \frac{T_{\text{흡기}} + T_{\text{배기}}}{T_{\text{흡기}}} \times 100$$

여기서 : P : 누설률

C_1 : 챔버내 농도

C_2 : 측정된 평균농도

$T_{\text{흡기}}$: 흡기전체시간

$T_{\text{배기}}$: 배기전체시간

IV

마스크의 기준 및 시험방법

<기 준>

1. 성 상 : OO색의 △△△(재질) 마스크로서 안면부와 ◇◇색의 머리끈 등으로 구성되어 있다.
2. 형 상 : 다음 시험법에 따라 시험할 때 구성부위의 표시치수 및 기준은 아래와 같다. (주의 : 가로 및 세로의 정의에 대하여 표기할 것)

- 아 래 -

구성부위	설명	치 수
본체	가로	OO±OOmm
	세로	OO±OOmm
머리끈	길이	좌, 우 OO±OOmm
	폭	OO±OOmm

3. 고정용 머리끈 접합부의 인장강도 : 다음 시험법에 따라 시험할 때 인장강도는 10 N 이상이어야 한다.
4. 순도시험 : 다음 시험법에 따라 산 및 알칼리, 형광, 포름알데히드, 색소 시험할 때 적합하여야 한다.
5. 안면부 흡기저항 : 다음 시험법에 따라 시험할 때 개개의 측정치

는 〇〇mmH₂O 이하이어야 한다. (기준치는 II절 마스크의 등급 및 기준 참조)

6. 분진포집효율 : 다음 시험법에 따라 시험할 때 개개의 측정치는 〇〇 % 이상이어야 한다. (기준치는 II절 마스크의 등급 및 기준 참조)

※ 마스크의 재질 및 제조공정에 따라 세부 시험항목이 달라질 수 있다.

<시 험 방 법>

1. 성 상 : 육안으로 관찰한다.

2. 형상 : 본품을 가지고 눈금자를 이용하여 측정한다.

(주의 : 본품을 가지고 가로, 세로에 대한 정의에 맞게 측정한다.)

3. 머리끈 접합부의 인장강도

본품의 특성에 따라 품질관리 가능한 시험조건으로 인장강도를 측정한다.

(주의 : 시험기기 및 방법을 상세하게 기재한다)

작성 예) 본품의 머리끈 한쪽과 본품 본체 절반이 한개의 검체가 되도록 마스크의 세로방향으로 절단한다. 시험장치는 검체를 파지하기에 적당한 평평한 모양의 클램프를 가진 일정한 속도를 가진 시험장치를 쓴다. 준비한 검체를 인장시험기 양쪽의 클램프에 구김 없는 자연상태로 고정시키고 20 cm/분의 속도로 잡아당겨

머리끈과 마스크의 접촉부위가 절단될 때의 최대의 하중(N)을 읽는다. 검체 3 개에 대한 평균치를 구한다.

4. 순도시험

(1) 산 및 알칼리

본품에서 외피, 내피, 필터 부분을 각각 동일한 크기로 취하여 합한 다음 '대한약전외 의약품등기준' 「부직포」의 '산 및 알칼리' 항에 따라 시험한다.

(2) 형광

본품에서 안쪽 부분을 '대한약전외 의약품등기준' 「부직포」의 '형광' 항에 따라 시험한다.

(3) 포름알데히드

본품에서 외피, 내피, 필터 부분을 각각 동일한 크기로 취하여 합한 다음 '대한약전외 의약품등기준' 「부직포」의 '포름알데히드' 항에 따라 시험한다.

(4) 색소

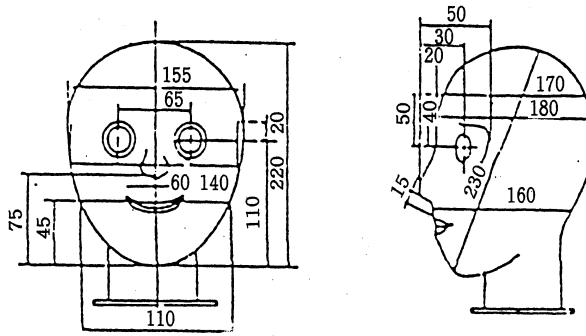
본품에서 색상 있는 부분을 취하여 '대한약전외의약품등기준' 「부직포」의 '색소' 항에 따라 시험한다. 다만, 색상이 있는 제품에 한하여 시험한다.

5. 안면부 흡기저항

본품 6 개를 가지고 3 개는 제품 그대로, 나머지 3 개는 미리 온도 38 ± 2.5 °C, 습도 85 ± 5 %RH에서 24 ± 1 시간 동안 방치한 것을 시험용 검체로 사용한다.

시험용 검체의 안면부를 아래 그림과 같은 표준머리 모형에 착용시킨 다음 공기를 분당 30 L의 연속유량으로 통과시켰을 때의 수

주(mmH₂O)를 측정한다.



(단위: mm)

<그림> 표준머리 모형

6. 분진포집효율시험

가. 염화나트륨 에어로졸(NaCl Aerosol)을 이용하여 다음 시험방법에 따라 시험하여야 한다.

(1) 본품 6 개를 가지고 3 개는 제품 그대로, 나머지 3 개는 미리 온도 38 ± 2.5 °C, 습도 85 ± 5 %RH에서 24 ± 1 시간 동안 방치한 것을 시험용 검체로 사용한다.

(2) 시험 방법

(가) 염화나트륨 시약을 물에 녹여 1 % 염화나트륨 용액을 만든 다음 자동필터 검사장비를 이용하여 염화나트륨 에어로졸을 발생시킨다.

- (나) 염화나트륨 에어로졸의 입경분포는 $0.04 \mu\text{m} \sim 1.0 \mu\text{m}$ 이며, 평균 입경은 약 $0.6 \mu\text{m}$ 이다.
- (다) 염화나트륨 에어로졸의 유량은 분당 95 L이며, 농도는 $8 \pm 4 \text{ mg/m}^3$ 이다.
- (라) 검체의 안면부를 자동필터 검사장비에 넣고 염화나트륨 에어로졸을 분당 95 L의 유량으로 안면부에 통과시킨 다음 안면부 통과 전후의 농도를 측정한다. 이 때의 측정값은 30 ± 3 초 사이에서 얻어진 평균값으로 하되, 시험 시작 후 3분 이내에 측정되어야 한다.
- (마) 계 산

$$P(\%) = \frac{C_1 - C_2}{C_1} \times 100$$

여기서 P : 분진 포집효율

C1 : 안면부 통과 전의 염화나트륨 농도

C2 : 안면부 통과 후의 염화나트륨 농도

나. 파라핀 오일의 미스트를 이용하여 다음 시험방법에 따라 시험한다

- (1) 본품 6 개를 가지고 3 개는 제품 그대로, 나머지 3 개는 미리 온도 $38 \pm 2.5 \text{ }^\circ\text{C}$, 습도 $85 \pm 5 \text{ \%RH}$ 에서 24 ± 1 시간 동안 방치한 것을 시험용 검체로 사용한다.
- (2) 시험방법
 - (가) 파라핀 오일 미스트를 자동 필터 검사장비를 이용하여 발생시킨다.
 - (나) 파라핀 오일 미스트의 입경분포는 $0.05 \sim 1.7 \mu\text{m}$ 이며, 평균 입경은 약 $0.4 \mu\text{m}$ 이다.

- (다) 파라핀 오일 미스트의 유량은 분당 95 L이며, 농도는 $20 \pm 5 \text{ mg/m}^3$ 이다.
- (라) 검체의 안면부를 자동필터 검사장비에 넣고 파라핀 오일 미스트를 분당 95 L의 유량으로 안면부에 통과시킨 다음 안면부 통과 전후의 농도를 측정한다. 이 때의 측정값은 30 ± 3 초 사이에서 얻어진 평균값으로 하되, 시험 시작 후 3 분 이내에 측정되어야 한다.
- (마) 계 산

$$P(\%) = \frac{C_1 - C_2}{C_1} \times 100$$

여기서 P : 분진 등 포집효율

C1 : 안면부 통과 전의 파라핀 오일 미스트 농도

C2 : 안면부 통과 후의 파라핀 오일 미스트 농도

**멸균 의약품의 평가
가이드라인**

사람이나 동물의 질병을 치료·경감·처치 또는 예방할 목적으로 사용되는 섬유·고무제품 또는 이와 유사한 것에 해당하는 제품들은 약사법에 따라 의약품으로서 식품의약품안전청에서 품목별 심사 및 허가를 하고 있습니다. 이와 같은 제품중에는 방사선 조사 또는 에틸렌가스 살균 방식을 이용하여 멸균 공정을 거쳐 공급되는 제품들이 있습니다.

방사선 멸균의 경우 방사선 조사 후 제품의 효능변화, 독성학적 안전성, 물리화학적 안정성, 그리고 생물학적 활성 등에 영향을 받을 수 있으므로 방사선 조사된 제품의 품목 허가를 받기 위해서는 안정성 자료를 제출하여야 합니다.

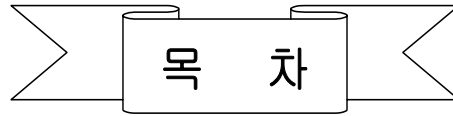
본 가이드라인은 방사선멸균제품의 안정성 시험 및 에틸렌옥사이드 잔류량 시험의 표준화된 시험법과 기준 자료제출 요건 등이 제시되어 있습니다.

또한, 이 가이드라인은 현재까지의 경험과 과학적 사실에 근거한 것이므로 새로운 과학적 근거가 있을 경우 언제든지 개정될 수 있으며 이러한 사항이 있을 경우 식품의약품안전청에 의견을 제시하여 주시기 바랍니다.

※ 본 지침에 대한 의견이 있을 경우 식품의약품안전청 바이오생약국 화장품심사과로 문의하시기 바랍니다.

전화번호 02-380-1721~2

팩스번호 02-385-2154



목 차

I. 서론	25
II. 방사선 멸균 제품의 안정성 시험	26
1. 용어 정의	26
2. 시험기준	26
3. 시험방법	28
4. 시험자료의 제출	33
III. 에틸렌옥사이드 멸균 제품의 에틸렌가스 잔류량 시험	35
1. 시험기준	35
2. 시험방법	35
3. 시험자료의 제출	37
IV. 참고 문헌	38

1. 이 가이드라인은 방사선 멸균의 경우 「의약품등의 품목허가·신고·심사규정」 식약청고시 제2009-42호(2009.6.30.) 제14조7항과 에틸렌옥사이드 멸균의 경우 의약외품에 관한 기준 및 시험방법 식약청고시 제2009-6호(2009.2.23)와 관련하여 제출되는 멸균 의약외품의 심사와 관련된 가이드라인이다.
2. 「의약품등의 품목허가·신고·심사규정」 식약청고시 제2009-42호(2009.6.30.) 제14조7항에 “필요에 따라 최종제품을 방사선조사하여 멸균하는 경우에는 그 조건(방사선량, 시간 등)을 명기하되, 방사선을 조사한 제품과 조사하지 아니한 제품에 대한 분해산물 생성유무비교 등 안정성시험자료(3개 로트)를 첨부하여야 한다.”로 규정되어 있다.
3. 의약외품에 관한 기준 및 시험방법 중 「생리처리용 탐폰의 기준 및 시험방법」에 “에틸렌옥사이드(EO) 가스 잔류량 시험은 에틸렌옥사이드 가스로 멸균하는 제품에 대해 시행한다.”로 규정되어 있다.
4. 이 가이드라인은 의약외품을 제조·수입하는데 있어 제품에 따라 필요한 멸균공정 중 방사선 및 에틸렌옥사이드 멸균 제품에 대하여 심사시 필요한 자료를 준비하는데 도움을 주기 위한 것이다.

II

방사선 멸균 제품의 안정성 시험

의약품등은 제조과정 중에서 방사선 조사 후 제품의 효능변화, 물리화학적 안정성, 생물학적 독성 등이 영향을 받을 수 있다. 따라서, 방사선 멸균제품을 허가받기 위해서는 방사선 조사로 인한 물리화학적 변화나 분해산물 생성 유무를 확인하기 위하여 다음과 같은 안정성 시험자료를 제출하여야 한다.

1. 용어 정의

- ① 멸균 : 물질 중에서 모든 미생물을 물리적·화학적 자극을 가하여 사멸시키든가 제거하는 것을 말한다. 따라서, 대상을 완전히 무균상태로 하는 멸균과 거의 무균상태에 이르도록 하는 소독과 구별된다.
- ② 가속시험 : 짧은 기간으로 가속조건에서 의약품등의 안정성에 미치는 영향을 평가하기 위한 시험을 말한다.

2. 시험기준(가속시험)

1) 기준

가. 기준 및 시험방법에 설정되어 있는 항목의 경우 그 기준에 적합하다.

나. 용출물 시험의 경우 다음 기준에 적합하다.

- ① pH 기준 : 검액 및 대조액의 pH 차이는 1.5 이하이다.
- ② 자외부흡수스펙트럼(이하 UV) 기준 : 220 ~ 241nm 미만에

서의 흡광도는 0.08 이하, 241 ~ 350 nm 이하에서의 흡광도는 0.05 이하이다.

- ③ 세포독성 기준 : 세포군락 형성율이 50%가 되는 검액의 농도(IC₅₀(%))는 90% 이상이다. 그 외의 표준시험법을 썼을 때 결과는 음성이다.

2) 로트의 선정

가. 시판할 제품과 동일한 처방, 제형 및 포장용기를 사용한다.

다만, 안정성에 영향을 미치지 않을 것으로 판단되는 경우에는 예외로 할 수 있다.

나. 3로트 이상에 대하여 시험하는 것을 원칙으로 한다.

- 3) 보존조건 : 온도는 40±2℃, 상대습도는 75±5% 또는 온도에 따른 적절한 상대습도를 고려하여 장기보존시험 지정 저장온도보다 15℃ 이상 높은 온도로 한다. 다만, 반투과용기의 경우 온도 40±2℃, 상대습도 25%이하로 한다.

- 4) 시험기간 : 6개월 이상 시험한다.

- 5) 측정시기 : 시험개시일로부터 2개월 간격으로 시험개시 때를 포함하여 최소 3번의 시험이 수행되어야 하며, 개발단계 도중 가속시험에서 유의적인 변화가 관찰된 경우에는 최소 4번의 시험이 수행되어야 한다.

(유의성 있는 변화의 예)

가) 규격에 적합하지 않는 경우

나) 초기값보다 5% 이상의 함량변화가 있는 경우

다) 제형에 따라 pH 또는 용출시험(pH, UV, 세포독성) 결과가 기준에 적합하지 않은 경우

라) 성상, 물리적 성질, 기능적 시험에서 기준에 적합하지 않은 경우

6) 시험항목 :

가. 방사선을 조사한 제품과 조사하지 아니한 제품에 대하여 기준 및 시험방법에 설정되어 있는 전 항목을 원칙으로 한다.

나. 방사선을 조사한 제품과 조사하지 아니한 제품에 대하여 분해산물 생성유무 비교 시험을 한다.

※ 함량시험 등으로 분해산물 비교가 가능한 경우 방사선 조사 전후의 분해산물 생성유무를 LC, GC 등의 방법으로 입증가능하나, 탈지면, 거즈 등 의약외품의 경우에는 대부분 HPLC 분석 등의 방법으로 분해산물 비교가 불가능하기 때문에 용출물의 pH, UV 시험자료를 제출하여야 한다. 함량시험이 가능한 경우에는 성분 분석을 통하여 분해산물이 있는 경우 세포독성시험 결과를 제출하여야 한다. 또한, 팩 거즈 등 플라스틱을 포함하고 있는 경우에는 용출물의 세포독성시험 자료를 제출하여야 한다.

3. 시험방법

1) 기준 및 시험방법에 설정된 항목은 허가받은 기준의 시험방법에 따라 시험한다.

2) 용출물에 대한 pH, UV, 세포독성 시험

가. 검액 및 대조액의 제조

방사선을 조사한 제품을 검체로 하여 앞뒤 양면의 표면적 합계가 약 600cm²가 되도록 잘라 절단편을 모으고 이들을 적당한 크기로 잘게 잘라 물로 씻은 다음 실온에서 건조한다. 이 건조물을 용기에 넣고 물 200mL를 정확하게 넣어 적당하게 마개를 한 다음 121℃에서 1시간 고압증기멸균기로 가열한

다음 용기를 꺼내어 실온이 될 때까지 방치하고 추출액을 검액으로 한다. 따로 방사선을 조사하지 않은 제품을 가지고 같은 방법으로 조작하여 대조액을 만든다. 검액 및 대조액을 가지고 다음 시험을 한다.

나. 조 작

- (1) pH : 검액 및 대조액 20mL 씩을 취하여 여기에 염화칼륨액(1→1000) 1.0 mL 씩을 넣고 두 액의 pH를 측정하여 그 차이를 산출한다.
 - (2) UV : 검액 및 대조액을 가지고 자외가시부흡광도측정법에 따라 시험하여 파장 220 ~ 240 nm 및 241 ~ 350 nm에서 최대흡광도를 측정한다.
 - (3) 세포독성 : 본 실험은 세포배양 기술을 이용하여 방사선 조사 제품의 용출물에 의한 세포의 용해(세포괴사), 세포성장 저해 및 그 외 세포에 미치는 영향에 대하여 알아보는 실험이다. 검액을 만들 때는 미생물과 다른 이물에 의한 오염이 나타나지 않도록 조심할 필요가 있다. 이 시험법 이외에도 동 시험법과 동등 이상의 표준시험방법을 쓸 수 있다 다만 시험결과에 대하여 의심이 있을 때에는 이 방법에서 규정하는 방법으로 최종 판정한다.
- ① 세포주 : 세포주는 L929세포 (ATCC CCL1)로 한다. 이 세포를 소태아혈청이 첨가된 이글최소필수배지에 계대배양한다. 세포층이 80% 이상 플레이트를 덮을 때까지 이산화탄소농도가 5±1%, 온도가 36 ~ 38℃ 인 이산화탄소배양기에서 24시간 이상 배양한다. 현미경으로 세포배양액을 관찰할 때 균일하고 일정한 세포층을 갖는지 확인한다. 다만 미리 세포균락의 형태와 결과의 재현성을 검정하여 그것

이 기재된 세포주와 거의 같으면 다른 세포주도 쓸 수 있다.

- ② 배지 : 이글최소필수배지를 쓴다. 다음의 물질들을 물 1000mL에 녹이고 121℃에서 20분간 고압증기멸균하고 실온까지 식힌 다음, 따로 멸균하여 둔 탄산수소나트륨용액 22mL 및 글루타민용액 10mL를 넣는다. 여기에 소태아혈청을 10 v/v %가 되도록 넣는다.

염화나트륨	6.80g	염화칼륨	400mg
인산이수소나트륨(무수)	115mg	황산마그네슘(무수)	93.5mg
염화칼슘(무수)	200mg	포도당	1.00g
L-알기닌염산염	126mg	L-시스테인염산염(일수화물)	31.4mg
L-티로신	36.0mg	L-히스티딘염산염(일수화물)	42.0mg
L-이소로이신	52.0mg	L-로이신	52.0mg
L-리신염산염	73.0mg	L-메티오닌	15.0mg
L-페닐알라닌	32.0mg	L-트레오닌	48.0mg
L-트립토판	10.0mg	L-발린	46.0mg
숙신산	75.0mg	숙신산나트륨(육수화물)	100mg
중타르타르산콜린	1.8mg	폴산	1.0mg
미오이노시톨	2.0mg	니코틴산아미드	1.0mg
D-판토텐산칼슘	1.0mg	염산피리독살	1.0mg
리보플라빈	0.1mg	염산티아민	1.0mg
비오틴	0.02mg	페놀레드	6.0mg

다. 시약

- ① 탄산수소나트륨용액 : 탄산수소나트륨 10g을 물에 녹여 100mL로 하고 기밀상태로 121℃에서 20분간 고압증기멸균

하거나 공경 0.22 μ m 이하의 멤브레인필터로 여과하여 멸균한다.

- ② 글루타민용액 : L-글루타민 2.92g을 물에 녹여 100mL로 하고 공경 0.22 μ m 이하의 멤브레인필터로 여과하여 멸균한다.
- ③ 염화나트륨완충액 : 염화칼륨 0.20g, 인산이수칼륨 0.20g, 염화나트륨 8.00g 및 인산수소이나트륨(무수) 1.15g을 물에 녹여 1000mL로 하고 121 $^{\circ}$ C에서 20분간 고압증기멸균한다.
- ④ 트립신용액 : 트립신 0.5g, 에틸렌디아민테트라아세트산디나트륨 0.2g을 인산염 완충액에 녹여 1000mL로 하고 공경 0.22 μ m 이하의 멤브레인필터로 여과하여 멸균한다.
- ⑤ 묽은 포름알데히드시액 : 포름알데히드액을 물로 10배 희석한다.
- ⑥ 묽은 감자시액 : 감자시액을 희석액으로 약 50배로 희석하고 여과지로 여과하여 불용물을 제거한다. 쓸 때 만든다.
※ 감자시액 : 아주르 II-에오신 3g 및 아주르 II 0.8g을 글리세린 250g에 넣고 60 $^{\circ}$ C에서 가온하여 녹인 다음 식히고 메탄올 250g을 넣어 잘 섞어서 만든다. 24시간 방치한 다음 여과한다. 마개를 하여 보존한다.
- ⑦ 희석액 : 인산이수소칼륨 4.54g 및 무수인산수소이나트륨 4.75g을 물에 녹여 1000mL로 한다.

라. 기구 및 장치

- ① 피펫 : 파스퇴르피펫, 메스피펫, 팁식미량피펫
- ② 나사마개 유리병 : 50 ~ 1000mL
- ③ 플라스틱제 멸균원심침전관 : 15mL 및 50mL
- ④ 플라스틱제 멸균배양플라스크 : 25cm² 또는 75cm²
- ⑤ 플라스틱제 멸균배양플레이트 (24칸)

- ⑥ 현미경 : 도립(倒立)현미경 및 실체현미경
- ⑦ 이산화탄소배양기 : 이산화탄소 농도를 5%로 하고 온도를 37℃로 유지
- ⑧ 양성대조 배양액 : 아연디에틸디티오카바메이트를 함유하는 폴리에틸렌 필름 등 제품의 특성에 적합한 것으로 선정
- ⑨ 음성대조 배양액 : 폴리에틸렌 필름 등 제품의 특성에 적합한 것으로 선정

마. 조작

- (1) 세포부유액의 조제 : 세포를 배양하여 둔 플라스틱제 멸균배양플라스크로부터 배지를 제거하고 인산염완충액 적당량을 가만히 넣어 플라스크를 천천히 2, 3회 기울여 세포층을 씻은 다음 인산염완충액을 버린다. 트립신시액을 세포층이 노출되지 않을 정도로 넣고 플라스크의 마개를 하여 이산화탄소배양기에 넣고 1 ~ 2분간 방치한다. 플라스크를 배양기에서 꺼내어 벗겨진 상태를 현미경으로 관찰한다. 배지 적당량을 넣어 파스퇴르피펫으로 가만히 취하여 세포를 플라스크 벽면으로부터 완전하게 벗겨낸다. 이 액을 플라스틱제 멸균원심분리관에 옮기고 1분간 800 ~ 1000회전으로 2 ~ 5분간 원심분리한다. 상정액을 버리고 새로운 배지 일정량을 넣은 다음 파스퇴르피펫으로 가만히 취하여 균질한 세포부유액을 만들어 세포농도를 혈구계산판을 써서 측정한다.
- (2) 세포독성시험 : 세포부유액을 배지로 희석하여 세포농도를 10^5 개/mL로 한다. 이 액 0.5mL씩을 플라스틱제 멸균배양플레이트의 각 칸에 분주한다. 배양플레이트를 이산화탄소배양기 중에서 4 ~ 6시간 정치하여 세포를 플레이트의 밑판에 접착시킨다. 배양플레이트의 각 칸의 배지를 버리고 앞

서 조제한 여러 농도의 검액, 대조액 또는 새로운 배지 0.5mL를 각각의 칸에 넣는다. 각 액의 조건마다 각각 4칸을 사용한다. 배양플레이트는 바로 이산화탄소 배양기에 다시 넣어 정해진 기간 배양한다. 배양기간은 L929 세포는 7 ~ 9 일간 한다. 배양이 끝난 다음 배양플레이트의 검액 등을 버리고 묽은 포름알데히드시약을 적당량 넣고 약 30분간 방치하여 세포를 고정한다. 각 칸의 묽은 포름알데히드시약을 버리고 묽은 김자시약을 적당량 넣는다. 세포균락이 잘 염색된 것을 확인한 다음 묽은 김자액을 버리고 각 칸의 세포 균락수를 센다. 각 농도의 검액의 세포균락수를 평균하고 그 값은 배지만일 때의 세포균락수의 평균값으로 나누어 해당검액 및 대조액의 세포균락형성율(%)을 산출한다. 편대수 그래프용지의 대수축에 검액농도(%)를, 다른 한편의 축에 세포균락 형성율을 취하여 얻은 결과를 플롯하여 증식저해곡선을 얻는다. 이 곡선으로부터 세포균락 형성율이 50%가 되는 검액농도[IC₅₀(%)]를 읽는다. 필요하다면 양성대조배양액 또는 음성대조배양액을 시험하여 시험의 감도나 재현성을 확인한다.

4. 시험자료의 제출

시험자료는 이 규정의 시험기준에 따라 설비가 충분한 시설에서 경험과 책임이 있는 시험자에 의하여 검증된 시험법에 따라 실시한 자료이어야 하며, 다음과 같은 내용이 포함되어야 한다.

- 1) 시험기관의 명칭, 소재지, 시험에 사용된 주요설비 등 시설에 관한 사항

- 2) 시험책임자 및 시험자의 성명
- 3) 제품명, 첨가제를 포함한 원료약품의 분량, 용기 및 포장형태,
제조일자, 생산량 및 제조번호
- 4) 시험보고서
예시) 용출물에 대한 세포독성시험
 - ① 시험일자 및 기간
 - ② 시료에 대한 설명
 - ③ 세포주
 - ④ 배지
 - ⑤ 시험방법
 - ⑥ 음성, 양성 및 대조군
 - ⑦ 관찰사항, 시험결과 및 분석
 - ⑧ 그 외 결과 평가에 필요한 관련자료
- 5) 시험결과에 대한 시험책임자의 종합의견

III

에틸렌옥사이드 멸균 제품의 에틸렌가스 잔류량 시험

에틸렌옥사이드 가스로 멸균한 탐폰의 경우에는 기준 및 시험방법에 다음과 같은 에틸렌옥사이드 및 에틸렌하이드린 잔류량시험을 설정하여야 한다.

1. 시험기준

에틸렌옥사이드 가스로 멸균한 제품을 가지고 시험할 때 에틸렌옥사이드(EO) 및 에틸렌클로로하이드린(ECH)은 각각 25 ppm 이하이어야 한다.

2. 시험방법

검체 1개를 취하여 가늘게 잘라 마개 달린 플라스크에 넣고 에탄올 50mL를 정확하게 넣은 다음 마개를 하고 70℃ 수욕조에서 2시간 진탕 추출한다. 추출한 다음 20℃로 식힌 후 여과하여 얻은 여액을 검액으로 한다. 따로 에틸렌옥사이드(EO) 표준원액 적당량을 정확하게 취하여 에탄올을 넣어 에틸렌옥사이드 농도를 1.0 ppm ~ 30.0 ppm 함유하도록 희석하여 에틸렌옥사이드 표준액으로 한다. 에틸렌클로로하이드린(ECH)을 가지고 동일한 방법으로 조작하여 에틸렌클로로하이드린 표준액으로 한다. 검액 및 표준액(에틸렌옥사이드 및 에틸렌클로로하이드린) 각 2 μ L씩을 가지고 다음 각각의 조건으로 기체크로마토그래프법에 따라 시험하고, 표준액의 피크에서 얻은 검량선을 써서 검액의 에틸렌옥사이드 및 에

틸렌클로로하이드린의 잔류량을 구한다.

(에틸렌옥사이드 조작조건)

검출기 : 수소불꽃이온화검출기

칼럼 : 안지름 약 3mm, 길이 약 2m인 스테인레스강관에 충전제로서 폴리에틸렌글리콜 6000을 실란처리한 60 ~ 80 μm 의 크로모솔브 W에 10% 비율로 피복시킨 것을 충전한다.

칼럼온도 : 60°C 부근의 일정온도

주입구온도 : 120°C 부근의 일정온도

검출온도 : 120°C 부근의 일정온도

운반기체 : 질소

유량 : 60mL/분

(에틸렌클로로하이드린 조작조건)

검출기 : 수소불꽃이온화검출기

칼럼 : 안지름 약 3mm, 길이 약 2m인 스테인레스강관에 충전제로서 폴리에틸렌글리콜 6000을 실란처리한 60 ~ 80 μm 의 크로모솔브 W에 10% 비율로 피복시킨 것을 충전한다.

칼럼온도 : 150°C 부근의 일정온도

주입구온도 : 215°C 부근의 일정온도

검출온도 : 215°C 부근의 일정온도

운반기체 : 질소

유량 : 60mL/분

3. 시험자료의 제출

시험자료는 이 규정의 시험기준에 따라 설비가 충분한 시설에서 경험과 책임이 있는 시험자에 의하여 검증된 시험법에 따라 실시한 자료이어야 하며, 다음과 같은 내용이 포함되어야 한다.

- 1) 시험기관의 명칭, 소재지, 시험에 사용된 주요설비 등 시설에 관한 사항
- 2) 시험책임자 및 시험자의 성명
- 3) 제품명, 제조일자 및 제조번호
- 4) 시험일자
- 5) 시험방법
- 6) 시험결과 및 분석

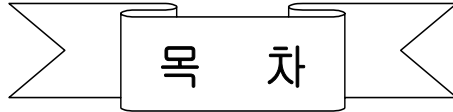
IV

참고 문헌

1. 의약품등의 품목허가·신고·심사 규정(식약청고시 제2009-42호, 2009. 6. 30)
2. 「의약품등의 품목허가·신고·심사 규정」 중 의약품등의 안전성·유효성 심사관련 해설서(2008. 12)
3. 의약품등의 안정성 시험기준(식약청고시 제2007-14호, 2007. 3. 19)
4. ISO 10993 Biological evaluation of medical device-part 5 : In vitro methods (Tests for cytotoxicity : in vitro methods)
5. 의약외품에 관한 기준 및 시험방법(식약청고시 제2009-6호, 2009. 2. 23)

전염병예방용 살충제 등의 효력시험 가이드라인

2009. 12.



목 차

I. 살충제 효력시험법	43
가. 직접분무 시험	44
나. 가열연막 시험	48
다. 잔류분무 시험	51
라. 극미량연무시험	55
마. 수면도포 시험	57
바. 독먹이 시험	60
II. 살서제 효력시험법	63
독먹이용 살서제의 효력시험	65
III. 살충제 저항성 시험법	74
가. 미량국소처리법	74
나. 침지처리법	79
다. 배지혼입법	87

위생해충의 종류는 모기, 파리, 바퀴, 진드기 등으로 매우 다양하다. 최근 많은 해충들의 살충제에 대한 저항성이 증가하여 몇몇 해충들은 복합저항성을 보여 방제에 어려움을 더하고 있다. 위생해충의 살충제에 대한 감수성은 종간에 큰 차이를 보이며, 살충제에 대한 저항성이 있는 계통은 감수성계통과 다르다. 따라서, 살충제의 효력시험은 여러 가지 종류의 해충을 적용하고, 각 해충에 있어서의 대표적인 저항성계통을 이용하여 살충제의 살충작용이 갖는 특이성을 파악할 필요가 있다. 따라서 살충제의 효력시험은 해충에 대한 작용 특이성을 추측할 수 있는 여러 종류의 시험법으로 수행하여 얻어진 결과를 종합 판단하여 야외에서의 방제효과를 추정하여야 한다. 야외 조건 하에서 살충제 및 살서제의 효력을 평가하기 위해서는 다양한 요인을 고려하여 실험을 수행하지 않으면 재현성, 반복성 및 정확성이 있는 자료를 얻을 수 없기 때문에 이와 같은 요인들을 고려한 표준화된 효력시험법이 필요하다.

살충제의 효력 평가방법은 국가 또는 국제기관별로 다소 차이가 있으나 세계보건기구의 WHOPES(World Health Organization Pesticide Evaluation Scheme)에서는 살충력 및 기피력을 측정하기 위한 시험방법을 상세히 제시하고 있으며 국제공인시험법으로서 널리 이용되고 있다. “Protocols for laboratory and field evaluation of insecticides and repellents”(CTD/WHOPES/IC/96.1)에서는 살충제 및 기피제 효력시험법에 대해 전반적으로 소개하고 있으며, “Guidelines

for testing mosquito adulticide for indoor residual spraying and treatment of mosquito net”(WHO/CDS/NTD/WHOPES/GCDPP/2006.3)에서는 야외 잔류분무 및 모기장 살포에 대한 살충효력실험법을 제시하고 있고, “Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides”(WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.13)에서는 모기 유충에 대한 성장억제제와 세균성 살유충제에 대한 효력시험법을 제시하고 있다. 미국재료시험학회(American Society for Testing and Materials, ASTM)에서도 살충력 및 기피력을 측정하기 위한 시험방법을 제시하고 있다.

살충제의 효력은 시험자와 사용하는 살충제의 종류 및 제형, 시험에 사용한 곤충의 상태에 따라서 많은 차이가 발생 할 수 있어, 이러한 오차를 줄이기 위해서는 표준화된 살충제의 효력시험법을 제정하여 각 시험기관에서 동일한 방법을 사용함으로써 제품에 대한 살충력의 비교가 가능하게 하여야 한다. 2003년도에 약사법이 개정되어 전염병예방용 살충제를 허가받기 위해서는 안전성 및 유효성자료의 제출이 의무화되어 있으며 이에 따라 식품의약품안전청은 여러 살충제 효력시험법의 장단점을 고려하여 국내 실정에 적합한 살충제의 효력시험 가이드라인을 마련하였다. 이 가이드라인은 전염병예방용 살충제의 효력을 평가하기 위한 표준화된 방법을 제시하여 살충제, 살서제 등의 심사에 도움을 주기위한 목적으로 작성되었다.

가. 직접분무 시험

개 요 : 살포입자가 100~400 μ m 정도로 크게 분사되는 분무의 형태로서 해충방제를 목적으로 직접 약제를 살포하여 즉시 약효를

발현시키는 살포방식이다. 직접 해충에게 처리하여야 하므로 약제 살포량이 방대하고 노동력이 많이 필요하므로 효율성은 적으나 일시에 많은 해충이 발생하여 순간적으로 그 밀도를 조절하는 데는 유용한 방법이다.

대상해충 : 모기 및 파리 성충

시험과정

<준비물>

- 장비 및 시험기자재
 - 생물검정용 노출장(bioassay cage)
 - 항온항습기((25℃, 상대습도 75± 5%) 또는 항온실((25℃)
 - 분석용 저울
 - 증류수 제조장치
 - 분무기
- 초자 및 재료
 - 유리 흡충관
 - 1 ~ 1.2 m 길이의 막대기 2개
 - 종이컵(지름 9cm, 높이 6cm)
 - 라벨
 - 증류수 또는 2~3일 이상 방치한 수돗물(수돗물에는 소독용 염소가 함유되어 있어 살충제의 종류에 따라서는 분해되는 경우가 있다).

<시험액 준비>

- ① 살충제를 증류수 또는 수돗물로 추천농도, 배량, 반량으로 희석한다. 시험액의 양은 분무기의 용량을 감안하여 1L 이상 준비한다.

<실험곤충 준비>

- ② 파리 및 모기는 야외에서 직접 채집하거나 또는 이것을 실내에서 누대사육한 5세대 이하의 성충으로 우화한 지 4~6일된 암컷성충을 준비한다.
- ③ 실험곤충 사육상을 적당한 크기의 비닐봉지 안에 넣은 후 에테르 또는 탄산가스를 사용하여, 실험곤충이 치사되지 않도록 적정시간 노출시켜 마취시킨다. 사육상 바닥에 떨어진 곤충을 여지로 쓸어 담은 후에 핀셋으로 암컷성충만 선별한다. 실험곤충을 생물검정용 노출장에 암컷성충 25마리씩 넣는다. 농도별로 5반복 시험이 되도록 준비한다.

<노출실험>

- ④ 실험하는 사람으로부터 1m 떨어진 위치에 2개의 막대기를 세운다. 막대기는 약 60cm 간격을 두고, 지상에서 1m 높이에 생물검정용 노출장을 설치한다.
- ⑤ 대조군은 물만을 처리한다. 물을 분무기 통에 넣고 압력이 40 lb/in²(760ml/분)이 되도록 압축시킨다음 하고, 분무기 노즐은 노출장보다 30cm 더 높은 위치에서 바람을 등지고 분사한다. 2개의 막대기 중앙에서 왼쪽으로 1m 전방에서 시작하여, 막대기를 지나 오른쪽으로 1m까지 분사하는데, 총 2m 거리를 7초간 분사한다. [40 lb/in²(760ml/분)인 경우 7초간 분사하며, 분당 분사되는 양이 적을 경우 분사시간을 길게 한다].
- ⑥ 낮은 농도의 시험액부터 시험한다. 대조군과 마찬가지로 분무기 통에 시험액을 넣고 노출장을 향하여 분사한다. 농도별로 3반복으로 실시한다.
- ⑦ 분무 후 약 10분간 막대기에 노출장이 매달려 있는 상태로 놓

아둔다.

- ⑧ 10분 후 노출장에서 실험곤충(모기, 파리)을 흡충관으로 잡아 종이컵에 옮기고 나서 망으로 덮고 고무줄로 묶은 다음 라벨을 붙인다.
- ⑨ 실험이 모두 끝나면 항온기(25℃) 또는 항온실(25℃)로 옮긴 후, 종이컵 망 위에 10% 설탕물을 적신 탈지면을 올려 놓는다.

<시험결과>

- ⑩ 24시간 후에 살충율을 조사하고, 각 농도마다의 평균 살충율을 산출한다. 가볍게 컵을 흔들어 확인하여 전혀 움직임이 없거나 경미한 움직임 또는 뒤집혀서 이동이 거의 불가능한 곤충은 죽은 것으로 간주한다.
- ⑪ 대조군에서 죽은 개체가 보일 경우 Abbott 공식을 이용하여 보정살충율을 구한다.

$$\text{보정살충율}(\%) = \frac{\text{실험군의치사율}(\%) - \text{대조군의치사율}(\%)}{100 - \text{대조군의치사율}(\%)} \times 100$$

- ⑫ 대조군의 치사율이 10% 이상인 경우에는 재 실험한다.

<효과판정>

- ⑬ 추천농도에서 80% 이상의 살충율을 보여야 한다.

※ 모기의 경우 집모기속에 속하는 빨간집모기, 지하집모기 및 작은 빨간집모기, 숲모기속에 속하는 한국숲모기, 흰줄숲모기 및 토고숲모기, 그리고 얼룩날개모기속에 속하는 중국얼룩날개모기 중에서 각기 속을 달리하여 2 종을 가지고 시험한다. 파리

의 경우에는 집파리를 가지고 시험한다.

나. 가열연막 시험

개 요 : 살충제 용제를 경유(또는 등유)로 희석한 용액이 400~600℃의 연소실을 통과하면서 분사되는 순간 경유는 기화되고 경유에 용해되어 있던 살충제 입자가 공간에 미립화되어 확산됨으로써 깊숙이 은신해 있는 해충을 방제하는 데 효과적이다. 생산되는 살충제 입자의 크기는 대부분 5~15 μm 로, 휴대용 연막기의 경우 보통 10m까지 유효하다.

대상해충 : 모기 및 파리 성충

시험과정

<준비물>

- 장비 및 시험기자재
 - 생물검정용 노출장(bioassay cage)
 - 항온항습기((25℃) 또는 항온실(25℃))
 - 분석용 저울
 - 증류수 제조장치
 - 연막기
- 초자 및 재료
 - 유리 흡충관
 - 1 ~ 1.2 m 길이의 막대기 2개
 - 종이컵(지름 9cm, 높이 6cm)
 - 라벨

- 증류수 또는 2~3일 이상 방치한 수돗물(수돗물에는 소독용 염소가 함유되어 있어 살충제의 종류에 따라서는 분해되는 경우가 있다.)
- 경유 (또는 등유)

<시험액 준비>

- ① 물에 녹는 살충제(유제, 유탁제)는 증류수(또는 수돗물)로, 물에 녹지 않는 살충제는 경유(또는 등유)를 사용하여 추천농도, 배량, 반량으로 희석한다. 시험액의 양은 연막기의 용량을 감안하여 1L 이상 준비한다.

<실험곤충 준비>

- ② 파리 및 모기는 야외에서 직접 채집하거나 또는 이것을 실내에서 누대사육한 5세대 이하의 성충으로 우화한 지 4~6일된 암컷성충을 준비한다.
- ③ 실험곤충 사육상을 적당한 크기의 비닐봉지 안에 넣은 후 에테르 또는 탄산가스를 사용하여, 실험곤충이 치사되지 않도록 적정시간 노출시켜 마취시킨다. 사육상 바닥에 떨어진 곤충을 여지로 쓸어 담은 후에 핀셋으로 암컷성충만 선별한다. 실험곤충을 생물검정용 노출장에 암컷성충 25마리씩 넣는다. 농도별로 3반복 시험이 되도록 준비한다.

<노출실험>

- ④ 연막기 노즐로부터 6m 떨어진 위치에 막대기를 2개 설치하고, 각 막대기에 1개씩 노출장을 설치한다. (막대간의 거리는 1m로 한다.) 바람이 전혀 없을 때나 풍속이 10km/h 이상일 때

는 피한다.

- ⑤ 대조군은 3개의 노출장에 6m 떨어진 위치에서 경유(또는 등유)만 넣고 분당 900ml로 10초간 분사한다. (시험약제에 영향을 받지 않도록 주의한다) 총 분사량은 150mL이며, 살포거리를 10m로 보면 살충제의 처리면적은 10m²가 된다. 살충제의 적용비율에 따라 분사시간을 달리할 수 있다.
- ⑥ 낮은 농도의 시험액부터 시험한다. 대조군과 마찬가지로 2개의 노출장에 6m 떨어진 위치에서 10초간 분사한다. 농도별로 3반복으로 실시한다.
- ⑦ 연막처리 후 약 10분간 막대기에 노출장이 매달려 있는 상태로 놓아둔다.
- ⑧ 10분 후 노출장에서 실험곤충(모기, 파리)을 흡충관으로 잡아 종이컵에 옮기고 나서 망으로 덮고 고무줄로 묶은 다음 라벨을 붙인다.
- ⑨ 실험이 모두 끝나면 항온기(25℃) 또는 항온실(25℃)로 옮긴 후, 종이컵 망 위에 10% 설탕물을 흡수시킨 탈지면을 올려 놓는다.

<시험결과>

- ⑩ 24시간 후에 살충율을 조사하고, 각 농도마다의 평균 살충율을 산출한다. 가볍게 컵을 흔들어 확인하여 전혀 움직임이 없거나 경미한 움직임 또는 뒤집혀서 이동이 거의 불가능한 곤충은 죽은 것으로 간주한다.
- ⑪ 대조군에서 죽은 개체가 보일 경우 Abbott 공식을 이용하여 보정살충율을 구한다.

$$\text{보정살충율(\%)} = \frac{\text{실험군의치사율(\%)} - \text{대조군의치사율(\%)}}{100 - \text{대조군의치사율(\%)}} \times 100$$

⑫ 대조군의 치사율이 10% 이상인 경우에는 재 실험한다.

<효과판정>

⑬ 추천농도에서 80% 이상의 살충율을 보여야 한다.

※ 모기의 경우 집모기속에 속하는 빨간집모기, 지하집모기 및 작은빨간집모기, 숲모기속에 속하는 한국숲모기, 흰줄숲모기 및 토고숲모기, 그리고 얼룩날개모기속에 속하는 중국얼룩날개모기 중에서 각기 속을 달리하여 2 종을 가지고 시험한다. 파리의 경우에는 집파리를 가지고 시험한다.

다. 잔류 분무 시험

개 요 : 살충제 희석액을 100~400 μm 의 큰 입자로 분사하며, 잔류 분무는 해충의 휴식장소, 서식장소 또는 활동장소에 잔효성의 살충제를 잔존시켜, 장시간에 걸쳐 대상해충이 접촉할 때마다 치사시키는 방법이다. 잔류 분무는 1회 처리로 장기간 방제효과가 있으며, 유제, 수화제를 대상으로 한다.

대상해충 : 모기, 파리, 바퀴, 개미

시험과정

<준비물>

- 장비 및 시험기자재
- 온도와 습도(25℃, 75±5%)가 잘 유지되는 항온항습기 또는

항온실

- 분석용 저울
- 증류수 제조장치
- 공기압축분무기
- 초자 및 재료
 - 유리 흡충관
 - 세계보건기구의 생물검정 콘
 - 분무처리 재료 : 수화제-수분흡수가 잘 되는 시멘트블록
유제-페인트 바른 나무판이나 타일, 장판
중 1가지
 - 비이커
 - 라벨
 - 증류수 또는 2~3일 이상 방치한 수돗물 (수돗물에는 소독
용 염소가 함유되어 있어 살충제의 종류에 따라서는 분해되
는 경우가 있다).

<시험액 준비>

- ① 살충제를 증류수 또는 수돗물로 추천농도, 배량, 반량으로 희석한다.

<대상재료 준비>

- ② 살충제 처리용 대상재료는 시험약제가 수화제이면 수분흡수가 잘 되는 시멘트블록 벽면으로 하고, 유제이면 수분 흡수가 잘 안되는 페인트 바른 나무 벽면, 타일 벽면, 장판 벽면 중에서 1가지를 준비한다.

<실험곤충 준비>

- ③ 실험곤충은 야외에서 직접 채집하거나 또는 이것을 실내에서 누대사육한 5세대 이하의 성충으로 한다. 모기와 파리의 경우 우화 후 4~6일된 암컷성충을, 바퀴의 경우 우화 후 10~15일된 암컷성충을 준비한다. 개미의 경우 야외에서 직접 채집한다.
- ④ 실험곤충 사육상을 적당한 크기의 비닐봉지 안에 넣은 후 에테르 또는 탄산가스를 사용하여, 실험곤충이 치사되지 않도록 적정시간 노출시켜 마취시킨다. 사육상 바닥에 떨어진 곤충을 여지로 쓸어 담은 후에 핀셋으로 암컷성충만 선별한다.
 - 모기 : 암컷 25마리/1회
 - 파리 : 암컷 25마리/1회
 - 바퀴 : 암컷 10마리/1회
 - 개미 : 암수 구별없이 25마리/1회

<노출실험>

- ⑤ 대조군은 물을 이용하여 대상재료에 40 mL/m²이 되도록 분무한다. 분무 요령은 공기압축분무기의 8002호 노즐과 대상재료간의 살포거리가 50 cm가 되도록 유지하면서 2.5 m 거리를 6초간 분무한다.
- ⑥ 낮은 농도의 시험액부터 대조군과 같은 방법으로 대상재료에 분무한다. 농도별로 3반복으로 실시한다.
- ⑦ 처리 벽면이 건조되면 생물검정 콘을 벽면에 부착시키고 실험곤충을 핀셋을 이용하여 넣어 준다. 위의 입구를 솜으로 막아 준다.
- ⑧ 30분간 노출시킨 다음 에테르나 탄산가스로 실험곤충을 마취시킨다. 모기, 파리는 종이 컵으로 옮겨 망을 씌운다. 바퀴는

상부로 나오지 못하도록 윗면에서 1/3 정도 위치에 오일을 처리한 비이커로, 개미는 오일을 처리한 작은 비이커로 옮긴다.

- ⑨ 모기와 파리는 종이컵 망 위에 10% 설탕물을 적신 탈지면을 올려 놓는다. 바퀴와 개미는 먹이와 물을 같이 공급한다.
- ⑩ 실험이 끝나면 항온기(25℃) 또는 항온실(25℃)로 옮긴다.

<실험결과>

- ⑪ 처리 후 3, 7, 14, 21, 28일째에 살충율을 조사한다. 전혀 움직임이 없거나, 경미한 움직임 또는 뒤집혀서 이동이 거의 불가능한 실험곤충은 죽은 것으로 간주한다.
- ⑫ 대조군에서 죽은 개체가 보일 경우 Abbott 공식을 이용하여 보정살충율을 구한다.

$$\text{보정살충율}(\%) = \frac{\text{실험군의치사율}(\%) - \text{대조군의치사율}(\%)}{100 - \text{대조군의치사율}(\%)} \times 100$$

- ⑬ 대조군의 치사율이 10% 이상인 경우에는 재 실험한다.

<효과판정>

- ⑭ 처리 21일째에 추천농도에서 80% 이상의 살충율을 보여야 한다.

※ 모기의 경우 집모기속에 속하는 빨간집모기, 지하집모기 및 작은빨간집모기, 숲모기속에 속하는 한국숲모기, 흰줄숲모기 및 토고숲모기, 그리고 얼룩날개모기속에 속하는 중국얼룩날개모기 중에서 각기 속을 달리하여 2 종을 가지고 시험한다. 바퀴의 경우 독일바퀴, 이질바퀴, 먹바퀴 중에서 1종을 가지고 시험하며, 파리의 경우에는 집파리를 가지고 시험한다.

라. 극미량연무(Ultra low volume) 시험

개 요 : 살충제 유제 또는 극미량 연무제로 가공된 제제를 희석하지 않고 특수화된 노즐의 기계적 변화에 의해 고농도 살충제를 미립화시켜 공간살포하는 방법으로, 생산되는 살충제 입자의 크기는 5~50 μ m 이다. 가열연막보다 입자가 크기 때문에 분사할 때 분사구를 45도 정도 상향하여 살포한다.

대상해충 : 모기 및 파리성충

시험과정

<준비물>

- 장비 및 시험기자재
 - 생물검정용 노출장(bioassay cage)
 - 항온항습기(25℃) 또는 항온실(25℃)
 - 메스실린더
 - 증류수 제조장치
 - 극미량 연무기
- 초자 및 재료
 - 흡충관
 - 1 ~ 1.2 m 길이의 막대기 2개
 - 종이컵(200ml)
 - 라벨

<시험액 준비>

- ① 살충제를 희석하지 않고 그대로 사용하거나 소량의 물로 희석한다.

<실험곤충 준비>

- ② 파리 및 모기는 야외에서 직접 채집하거나 또는 이것을 실내에서 누대사육한 5세대 이하의 성충으로 우화한지 4-6일된 암컷 성충을 준비한다.
- ③ 실험곤충 사육상을 적당한 크기의 비닐봉지 안에 넣은 후 에테르 또는 탄산가스를 사용하여, 실험곤충이 치사되지 않도록 적정시간 노출시켜 마취시킨다. 사육상 바닥에 떨어진 곤충을 여지로 쓸어 담은 후에 핀셋으로 암컷성충만 선별한다. 실험곤충을 생물검정용 노출장에 암컷성충 25마리씩 넣는다. 농도별로 3반복시험이 되도록 준비한다.

<노출실험>

- ④ 극미량 연무기 노즐로부터 6m 떨어진 위치에 막대기를 2개 설치하고, 각 막대기에 1개씩 노출장을 설치한다. 막대간의 거리는 1m로 하고 풍속이 10km/시간 이상일 때는 피한다.
- ⑤ 대조군은 2개의 노출장에 6m 떨어진 위치에서 물만 넣고 노즐을 45도 각도로 위로 향하여(상향하여) 분사한다. (시험약제에 영향을 받지 않도록 주의한다.)
- ⑥ 시험액은 검체를 희석하지 않고 그대로 사용하여 시험하며 8초간 노즐을 45도 각도로 위로 상향하여 분사한다.
- ⑦ 살포 후 약 10분간 막대기에 노출장이 매달려 있는 상태로 놓아둔다.
- ⑧ 10분 후 노출장에서 실험곤충(모기, 파리)을 흡충관으로 잡아 종이컵에 옮기고 망을 씌운 다음 종이컵에는 라벨을 붙인다.
- ⑨ 실험이 모두 끝나면 항온기(25℃) 또는 항온실(25℃)로 옮긴 후, 종이컵 망 위에 10% 설탕물을 흡수시킨 탈지면을 올려

놓는다.

<시험결과>

- ⑩ 24시간 후에 살충율을 조사하여 평균 살충율을 산출한다. 가볍게 컵을 흔들어 전혀 움직임이 없거나 경미한 움직임 또는 뒤집혀서 이동이 불가능한 곤충은 죽은 것으로 간주한다.
- ⑪ 대조군에서 죽은 개체가 보일 경우 Abbott 공식을 이용하여 보정살충율을 구한다.

$$\text{보정살충율(\%)} = \frac{\text{실험군의치사율(\%)} - \text{대조군의치사율(\%)}}{100 - \text{대조군의치사율(\%)}} \times 100$$

- ⑫ 대조군의 치사율이 10% 이상인 경우에는 재 실험한다.

<효과판정>

- ⑬ 추천농도에서 80% 이상의 살충율을 보여야 한다.

※ 모기의 경우 집모기속에 속하는 빨간집모기, 지하집모기 및 작은빨간집모기, 숲모기속에 속하는 한국숲모기, 흰줄숲모기 및 토고숲모기, 그리고 얼룩날개모기속에 속하는 중국얼룩날개모기 중에서 각기 속을 달리하여 2 종을 가지고 시험한다. 파리의 경우에는 집파리를 가지고 시험한다.

마. 수면도포 시험

개 요 : 가공한 기름제제를 수면 위에 뿌리면 단일분자막이나 응결막을 형성하며 모기유충이나 번데기가 호흡을 위하여 호흡기관을 수면 밖으로 내밀때 수면 위의 기름분자나 응결체들

이 모기유충의 호흡관을 막거나 호흡을 방해함으로써 질식사시켜 살충시키는 작용을 한다.

대상해충 : 모기유충과 번데기

시험과정

<준비물>

- 장비 및 시험기자재
 - 항온항습기(25℃) 또는 항온실(25℃)
 - 메스실린더
 - 증류수 제조장치
 - 모기유충 채집용 국자나 수서곤충 채집망
- 초자 및 재료
 - 스포이드
 - 흰색 사진현상판
 - 비이커(500 ml) 10개
 - 모기유충 채집컵 (25 ml) 10개
 - 라벨

<시험액 준비>

- ① 살충제를 희석하지 않고 그대로 사용하거나 소량의 물로 희석한다.

<실험곤충 준비>

- ② 비이커에는 증류수나 2-3일 동안 방치한 수돗물을 사용하여 225 ml 담는다. 농도구간별로 실험하는 것이 아니기 때문에

실험 개수에 따라 비이커를 준비한다.

- ③ 모기유충은 5개의 25 ml 플라스틱 컵에 미리 25마리씩 담아둔다. 그리고 번데기를 25마리씩 5개의 컵에 담아둔다. 플라스틱 컵의 물의 양은 25 ml을 채운다. 총 5반복 시험이 되도록 준비한다.

<노출실험>

- ④ 플라스틱컵에 25마리씩 준비된 모기유충과 번데기를 비이커에 옮겨 담는다.
- ⑤ 대조군은 그대로 두고 시험군 비이커의 수면에 시험액을 분무기로 3회 분사한다.
- ⑥ 처리가 끝나면 항온실(25℃)에 보관한다.

<시험결과>

- ⑦ 24시간 후에 모기유충과 번데기의 살충율을 조사하여 평균 살충율을 산출한다.
- ⑧ 대조군에서 죽은 개체가 있을 경우 Abbott 공식을 이용하여 보정살충율을 구한다.

$$\text{보정살충율}(\%) = \frac{\text{시험군의치사율}(\%) - \text{대조군의치사율}(\%)}{100 - \text{대조군의치사율}(\%)} \times 100$$

- ⑨ 대조군의 치사율이 10% 이상인 경우에는 재 실험한다.

<효과판정>

- ⑩ 평균 살충율이 80% 이상이어야 한다.

※ 모기의 경우 집모기속에 속하는 빨간집모기, 지하집모기 및 작

은뺨간집모기, 숲모기속에 속하는 한국숲모기, 흰줄숲모기 및 토고숲모기, 그리고 얼룩날개모기속에 속하는 중국얼룩날개모기 중에서 각기 속을 달리하여 2 종을 가지고 시험한다.

바. 독먹이 시험

개 요 : 살충제를 대상 곤충이 선호하는 먹이와 혼합하여 만든 독먹이로 유인하여 효력을 시험하는 방법으로 유인살충제라고도 불린다. 파리 성충, 바퀴 및 개미 등을 대상으로 하며, 과립, 젤, 분말, 고형상(정제, 도너츠 형)이 있다.

대상해충 : 파리 성충, 바퀴, 개미 등

시험과정

<준비물>

- 장비 및 시험기자재
 - 항온항습기(25℃) 또는 항온실(25℃)
 - 분석용 저울
 - 증류수 제조장치
- 초자 및 재료
 - 사각 유리용기(가로 63cm, 세로 63cm, 높이 6cm)
 - 페트리디쉬
 - 라벨
 - 증류수 또는 2~3일 이상 방치한 수돗물.

<시험액 준비>

- ① 추천약량, 배량, 반량이 되도록 독먹이제의 무게를 단 다음 페트리디쉬 넣고 라벨을 붙인다.

<실험곤충 준비>

- ② 파리 및 바퀴는 야외에서 직접 채집하거나 또는 이것을 실내에서 누대사육한 5세대 이하의 성충으로 한다. 파리의 경우 우화 후 4~6일된 암컷성충을, 바퀴의 경우 우화 후 10~15일된 암컷성충을 준비한다. 개미의 경우 야외에서 직접 채집한다.
- ③ 실험곤충의 섭식율을 높이기 위해 24시간 동안 물만 제공한다.
- ④ 실험곤충 사육상을 적당한 크기의 비닐봉지 안에 넣은 후 에테르 또는 탄산가스를 사용하여, 실험곤충이 치사되지 않도록 적정시간 노출시켜 마취시킨다. 사육상 바닥에 떨어진 곤충을 여지로 쓸어 담은 후에 핀셋으로 암컷성충만 선별한다.

<노출실험>

- ⑤ 사각 유리용기에 파리 및 바퀴 암컷성충 각각 50마리씩 방사한다. 개미의 경우 100마리씩 방사한다.
- ⑥ 독먹이가 들어 있는 페트리디쉬를 이 유리용기에 넣어 둔다. 농도별로 5반 복으로 실시한다.
- ⑦ 대조군은 시험군과 동일한 조건으로 하고 물과 먹이만 제공한다.
- ⑧ 실험이 끝나면 항온기(25℃) 또는 항온실(25℃)로 옮긴 후, 10% 설탕물이 들어 있는 삼각플라스틱에 탈지면을 넣어 입구 쪽을 평평하게 한다.

<시험결과>

- ⑨ 시험 후 7일간 24시간 마다 살충율을 조사하고, 각 농도마다의 평균 살충율을 산출한다. 침금 등으로 가볍게 찢었을 때

전혀 움직임이 없거나 경미한 움직임 또는 뒤집혀서 이동이 거의 불가능한 곤충은 죽은 것으로 간주한다.

- ⑩ 대조군에서 죽은 개체가 보일 경우 Abbott 공식을 이용하여 보정살충율을 구한다.

$$\text{보정살충율}(\%) = \frac{\text{실험군의치사율}(\%) - \text{대조군의치사율}(\%)}{100 - \text{대조군의치사율}(\%)} \times 100$$

- ⑪ 대조군의 치사율이 10% 이상인 경우에는 재 실험한다.

<효과판정>

- ⑫ 추천농도에서 80% 이상의 살충율을 보여야 한다.

※ 바퀴의 경우 독일바퀴, 이질바퀴, 떡바퀴 중에서 1종을 가지고 시험하며, 파리의 경우에는 집파리를 가지고 시험한다.

살서제는 유효성분을 경구적으로 섭취시켜서 쥐를 치사시키는 약제이기 때문에, 섭취성이 양호하여야 하며, 또한 쥐에 대한 독성이 강하여야 하고 안전성이 높아야한다. 오늘날 사용되고 있는 살서제는 거의 독떡이로서 사용되고 있으며, 이 방법은 쥐의 구제에 있어서 중요한 위치를 차지하고 있다.

외국의 살서제의 효력 평가방법은 국가별로 다소 차이가 있으나 살서제의 효력시험법으로 널리 이용되고 있는 미국재료시험학회(American Society for Testing and Materials, ASTM)의 시험방법, 즉 E 1163-98(Standard Test Method for Estimating Acute Oral Toxicity in Rats) 및 E 1372-95(Standard Test Method for Conducting a 90-Day Oral Toxicity Study in Rats)가 현재 이용되고 있으며, E 565-95(Standard Test Method for Efficacy of a Single-Dose Acute Rodenticide Under Laboratory Conditions for Commensal Roents)는 속효성 살서제의 유효성을 평가하는 시험법이며, E 593-95(Standard Test Method for Efficacy of a Multiple-Dose Rodenticide Under Laboratory Conditions)는 완효성 살서제의 유효성을 평가하는 시험법으로 두 시험법 모두 현재 개정 중에 있다. 또한 독일의 Biologische Bundesanstalt fur Land Forstwirtschaft의 시험방법인 “Richtlinie fur die Prufung von Nagetierbekämpfungsmitteln gegen Wanderatten (9-3.2)”도 국제공인시험법으로서 전문학술지에서 널리 이용되고 있다.

살서제 효력시험법은 제형 및 처리 장소 등에 따라 시험법이 다소

복잡하나 오늘날 사용되고 있는 살서제가 거의 독먹이로서 사용되고 있다는 점을 고려하여, 경제적이면서 재현성이 있으며 또한 국내 연구기관 또는 시험기관에서 간편하게 실험할 수 있는 독먹이제용 살서제의 효력시험법을 마련하였다. 이 가이드라인은 전염병예방용 살서제의 효력을 평가하기 위한 표준화된 방법을 제시하여 살서제의 심사에 도움을 주기 위한 목적으로 작성되었다.

독먹이용 살서제의 효력시험

1. 일반사항

- 1) “전염병예방용살서제”(이하 살서제로 칭함)라 함은 “병원균을 매개하여 사람에게 게 질병을 일으키는 쥐를 방제하기 위한 목적으로 사용하는 제제”를 말한다(식품의약품안전청고시 제 2005-26호).
- 2) 전염병예방용살서제의 사용장소는 「전염병예방법」에 정해진 바에 따라 상업용 건물, 공공기관용 건물, 산업용 건물, 주거 지역 및 공공건물, 의료용 건물 등 공중보건을 위한 장소에 처리하여야 한다.
- 3) 본 시험법은 시궁쥐, 곰쥐 및 생쥐를 포함한 가주성 쥐류의 구제를 위해 살서제의 유효성 평가를 위한 시험법이다. 또한, 쥐류와 비슷한 행동양식, 생리 및 섭식 선호성을 보이는 다른 설치류에도 적용할 수 있다.
- 4) 본 시험법은 다음과 같은 ‘독먹이제’ 정의에 부합하는 모든 제품의 심사에 적용될 수 있다. ‘독먹이제’란 살서제를 적당한 고체 사료 또는 음료에 섞거나 혹은 이미 사료 형태의 먹이로 가공 처리되어 사료처럼 섭취되는 고체나 액체 또는 반죽 형태의 물질을 말한다.

또한, 작용방식에 따른 제품의 분류는 다음과 같다.

- ① ‘만성살서제’란 쥐들이 그 제품을 수차례에 걸쳐 섭취한 후에 서야 죽는 약제를 말한다.
- ② ‘지효성 급성살서제’란 쥐들이 그 제품을 단 1회 충분한 양을 섭취하면 죽는 약제를 말하나 이 경우 제품을 섭취한 후 즉

시 죽지는 않는다.

③ '속효성 급성살서제'란 쥐들이 그 제품을 섭취한 후 즉시 죽는 약제를 말한다.

5) 보고서에는 살서제가 어느 그룹에 속하는지를 반드시 명시하여야 한다.

6) 미터법 단위를 사용한다.

2. 실험방법

2.1 실험동물

(1) 실험동물로는 야외에서 채집된 동물들을 사용하여야 한다. 시궁쥐, 곰쥐 또는 생쥐의 야외 군체는 야외에서 생체로 잡아, 실외에서 군체로 사육하든가 또는 그들의 생리적 및 행동적인 특징의 많은 부분을 자연 그대로 유지할 수 있는 실내조건 하에서 사육한다. 야외 쥐를 사육하는데 이용되는 번식용 군체는 성질이 유순하든가 또는 그들의 천성을 현저하게 변화시키는 다른 특성들을 염두에 두어 선택하지 않도록 한다.

(2) 실험 시작 전에, 실험동물들이 일정 정도의 순화기간을 통해 개별적인 섭식양상이나 집단행동에 있어서도 정상적인 행동을 보인다는 사실을 입증하여야 한다.

(3) 각 실험 마다 10마리(암컷 5마리, 수컷 5마리)를 사용하여 5마리씩 집단실험을 실시한다. 이 때 귀표를 하거나 다른 적당한 방법으로 각각의 동물을 확인한다.

(4) 각각의 동물의 체중을 적어도 1 g 단위로 기록한다.

(5) 실험동물들에 대한 자료들을 보고서에 명시한다.

2.2. 실험동물의 조건

- (1) 외견상 상처라든가 피부병에 의한 새로운 상처자국이 없이 건강이 양호한 동물들을 사용한다.
- (2) 실험 및 대조동물은 살서제를 포함한 어떠한 농약에라도 노출되지 않아야 한다. 단, 외부기생충 방제를 위해 적당한 농도의 피레스린 분제를 시험 개시 3일 전에 외적으로 실험 및 대조동물에 처리할 수 있다.
- (3) 시험개시 때의 실험쥐는 표 1에 기술되어 있는 체중등급 내에 들어가야 한다. 암컷과 수컷의 평균체중의 차이는 표 1의 값을 넘지 않도록 한다.

표 1. 실험쥐의 체중 등급

실험동물	체중 범위, g	성별에 따른 체중의 최대 차이, g
생쥐	10~25	3
시궁쥐	150~400	50
곰쥐	100~200	33

2.3 실험공간

- (1) 동물실험은 실험 사육상에서 수행한다.
 - ① 금속제 쥐 사육상은 생쥐의 경우 최소 $270 \times 220 \times 130$ mm³, 쥐의 경우 $420 \times 260 \times 180$ mm³ 정도 되어야 한다.
 - ② 이들 쥐 사육상은 선반에 놓아둔다.
 - ③ 쥐 사육상에 금속망사를 설치해 배설물이나 오줌이 통과할 수 있도록 한다.
 - ④ 쥐 사육상 밑에 상자 또는 다른 장비를 설치하여 사료용기에

서 떨어진 사료를 회수하고 나서 그 무게를 측정한다. 정확한 섭취량을 측정하기 위하여 먹지 않고 남은 먹이에 보탠 다음 원래 공급한 먹이 무게에서 이를 빼준다. 떨어진 사료가 축축하면 무게를 달기 전에 원래의 수분함량으로 건조한다.

- ⑤ 물은 원하는 만큼 공급한다. 쥐 사육용 유리 물병 또는 물 자동공급장치를 사용한다.

2.4 동물용 시설

- (1) 동물과 관련한 정밀한 물리적 요구조건을 모두 구비할 필요는 없으나, 동물용시설은 법 또는 법규가 요구하는 기준에 부합하여야 한다.
- (2) 온도는 $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 를 유지하여야 하며, 쥐 및 생쥐 사육용 권장 상대습도는 50~60% 이다.
- (3) 난방기 또는 공조기의 강한 기류가 직접 실험동물에게 향하지 않도록 한다.
- (4) 창문을 통한 자연채광이 바람직하나, 인공채광도 이용할 수 있다. 인공채광은 낮과 밤의 길이가 자연조건과 잘 부합되게 하거나, 12~16 시간의 광주기로 설정한다. 인공채광은 백열등 또는 형광등을 이용한다.
- (5) 실험 중의 동물은 소음이나 인간의 활동(예를 들면, 움직임)에 의한 과도한 또는 불필요한 스트레스를 받지 않도록 한다.

2.5 먹이

- (1) 먹이는 실험쥐들이 잘 수용하여야 한다. 식감이 결여된 먹이는 통상 사망률이 낮기 때문에, 쥐에 의한 먹이의 수용은 시험에 있어서 필수 부분이다.

- (2) 이상한 냄새 또는 방향으로 인하여 먹이를 오염시킬 수 있는 휘발성 화합물의 오염 가능성이 있는 곳에 먹이를 보관하지 않도록 한다.

2.6 실내 적응

- (1) 쥐 사육상에 1마리씩 넣어 둔다.
- (2) 야외에서 채집한 쥐의 경우, 실험 대기기간 중의 마지막 7일간은 실제로 실험이 수행될 실험실과 비교할 수 있는 실내조건(즉, 온도, 습도, 광 등) 하에 두어야 한다.
- (3) 적응기간 동안 사료용기에 시판용 쥐 사료를 매일 섭취하는 양보다 많이 공급한다. 각각의 동물의 기본 섭취량을 설정하기 위하여 이 기간 동안 사료의 섭취량 및 물 소비량을 측정하고 기록한다. 정상적으로 사료를 먹지 않거나 물을 마시지 않은 쥐들은 실험군 또는 대조군에서 제외시킨다.

2.7 실험절차

- (가) 실험동물들에게 심사약제만을 먹이로 제공한다. 각 사육상마다 하나의 사료용기에 충분한 양을 공급한다.
- (나) 섭취위치에 의한 편차를 줄이기 위해, 일단 동물을 쥐 사육상 및 선반위의 쥐 사육상에 넣으면, 실험기간 동안 실험실내의 쥐 사육상 및 선반의 위치를 바꾸지 않도록 한다.
- (다) 실험동물의 일일섭식량을 측정한다. 이 때 사료용기 및 먹이는 매일 새롭게 공급한다. 물은 쥐 사육용 유리 물병 또는 물 자동공급장치를 사용하여 원하는 만큼 공급한다.
- (라) 대조군의 동물들에게 예비실험, 실험 및 실험 후 관찰기간동안 전체를 통틀어 시판용 쥐 사료를 공급한다.

- (마) 실험동물의 사망일자 및 사망 시의 체중을 기록한다. 또한 관찰기간 동안 살아남은 모든 실험동물의 체중을 기록한다.
- (바) 실험기간은 표 2와 같다. 제시된 기간은 심사약제의 특정한 작용방식을 입증하기 위해 단축될 수 있으며, 관찰기간은 최소한의 기간으로서, 상황에 따라 연장될 수 있다.

표 2. 실험기간

약제 유형	쥐의 종류	순화기간	공복기간	노출기간	관찰기간
만성살서제	생쥐	7일 정도	제외	20일	14일
	시궁쥐	7일 정도	제외	10일	14일
	곰쥐	7일 정도	제외	14일	14일
급성살서제	생쥐	7일 정도	하룻밤	1일	7일
	시궁쥐	7일 정도	하룻밤	1일	7일
	곰쥐	7일 정도	하룻밤	1일	7일

2.8 효과 판정

- (1) 대조군의 사망율이 10%를 초과하면, 시험군에서의 사망율과는 관계없이 실험 그 자체를 무효로 하고 다시 실험한다.
- (2) 시험약제가 시궁쥐, 곰쥐 또는 생쥐에 대해 90% 또는 그 이상의 사망률을 보여야 유효한 것으로 평가한다. 단, 급성살서제의 경우에는 시험약제의 섭취 후 2일 이내에 90% 이상의 사망률을 보여야 한다.
- (3) 시험약제가 2 종 또는 그 이상의 가주성 쥐류를 구제하고자 하는 경우, 2 종 또는 3 종 가운데서 어느 1 종에 대한 사망률은 80% 이상이고, 나머지 종에 대해서는 90% 이상의 사망률

을 충족하여야 한다.

2.9 보고서

보고서는 다음과 같은 정보를 포함하여야 한다.

- (1) 실험동물의 종류, 출처, 성 및 실험 개시 때의 체중과 같은 기본 정보.
- (2) 독성물질, 농도, 비활성성분 및 입자크기 등에 관련된 정보.
- (3) 각 실험동물의 섭식량.
- (4) 각 실험동물의 사망일자 및 사망 시의 체중, 노출기간 및 관찰기간 중에 생존한 동물의 체중.
- (5) 이상하거나 자연스럽지 않은 행동양식.
- (6) 본 시험법에서 벗어난 변이 또는 시험기간의 길이, 온도, 먹이 등과 같은 특별한 조건을 명시하고 입증하여야 한다.

<보고서의 예시>

1 시험기관 :

2 심사제품

가) 제품명 :

나) 배치번호 :

다) 제조업자 :

라) 출하일자 :

마) 보관조건 :

바) 유효성분 및 농도 :

사) 비활성성분 :

아) 입자크기 :

3 실험동물

가) 종류 : (생쥐, 시궁쥐, 곰쥐)

나) 출처 :

다) 수 및 성별 : (암컷 5마리, 수컷 5마리)

라) 시험 개시 때의 체중 : (g)

4 실험조건

가) 실험공간의 종류 및 크기 : (케이지)

나) 실험의 종류 : (강제실험)

다) 작용방식 : (만성독물)

5 공복기간 : (시간단위로)

6 음료 및 사료

가) 음료 : (원하는 만큼)

나) 사료 : (밀)

7 사용

가) 혼합비 : (살서제:먹이)

나) 사용한 미끼 :

다) 시작시기 :

라) 노출기간 :

마) 관찰기간 :

8 제공량

가) 사료 : (g)

나) 제품 : (g)

9 날짜별 검사 :

10 섭취량

가) 사료 :

나) 제품 :

11 사망수 및 병든 수 :

12 비고 : 체중

13 시험결과

14 결론

15 장소, 날짜, 서명

야외 개체군의 경우 살충제에 대한 저항성 발달로 실제 방제에 있어서 실패하는 경우가 일어날 수 있다. 따라서 살충제의 효력시험에서는 실험곤충에 대하여 살충제에 대한 저항성을 시험할 필요가 있다. 다음은 모기, 파리 및 바퀴의 성충에 대한 살충성분의 저항성 시험에 가장 보편적으로 이용되고 있는 미량국소처리법, 침지처리법 및 배지혼입법 등에 대하여 기술한다.

가. 미량국소처리법(Topical application method)

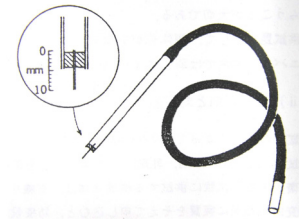
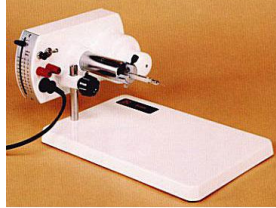
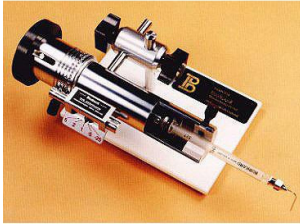
개 요 : 속효성 약제의 살충원제를 용매에 녹여 일정량을 미량국소 처리기로 곤충체의 일부에 점적, 부착시키는 방법으로 반수 치사약량(median lethal dose, LD50)을 구한다. 위생해충의 성충에 대한 살충성분의 효력 평가라든가 저항성 시험에 가장 보편적으로 이용되고 있다.

대상곤충 : 모기, 파리 및 바퀴 등의 성충

시험과정

<준비물>

- 장비 및 시험기자재
 - 수동식 미량국소처리기(hand microapplicator) 또는 자동식 미량국소처리기(automatic microapplicator)를 이용하며, 미량국소처리기가 없는 경우에는 1ml 용량의 미량 주사기(microsyringe)를 이용할 수 있다.



- 스테인레스 또는 철사를 이용하여 프레임(30 x 30 x 30 cm³)을 제작한 망사를 씌운 사육상
- 냉장고(4℃)
- 항온항습기(온도 25℃, 상대습도 75± 5%) 또는 항온실
- 분석용 저울
- 증류수 제조장치
- 탄산가스 통
- 초자 및 재료
 - 실험곤충 보관용 종이컵 또는 비닐컵(지름 9 cm, 높이 15 cm)
 - 500ml 삼각플라스크
 - 10ml 시험관(뚜껑을 돌려서 막을 수 있는 형태)
 - 에테르
 - 아세톤
 - 10% 설탕물
 - 비닐봉지(사육용기가 충분히 들어갈 수 있는 크기)
 - 라벨

<시험액 준비>

- ① 검체(살충제)를 아세톤에 희석하여 1% 농도가 되도록 5ml를

만든다. 시험액을 10ml 시험관에 넣고 용매가 증발하지 않도록 마개를 한 다음 4℃ 냉장고에 보관한다.

<실험곤충 준비>

② 실험곤충 준비

- 모기 : 표준감수성 계통, 실험실 계통 및 야외 채집종 또는 누대사육 5세대 이하의 암컷성충.
- 파리 : 표준감수성 계통(예를 들면 SRS 계통, CSMA 계통) 또는 실험실 계통 및 야외 채집종 또는 누대사육 5세대 이하의 암컷성충.
- 바퀴 : 표준감수성 계통 또는 실험실 계통 및 야외 채집종 또는 누대사육 5세대 이하의 암컷성충.

<노출실험>

- ③ 먼저 예비시험을 실시한다. 1% 시험액을 아세톤으로 10배 희석하여 0.1% 10ml를 만들고, 같은 방법으로 0.001%, 0.0001%, 0.00001%의 시험액을 만든다.
- ④ 실험곤충 사육상을 적당한 크기의 비닐봉지 안에 넣은 후 에테르 또는 탄산가스를 사용하여, 실험곤충이 치사되지 않도록 적정시간 노출시켜 마취 한다. 마취된 실험곤충을 500ml 삼각 플라스크에 담는다. 실험 도중에 마취에서 깨어나면 다시 마취시킨다.
- ⑤ 마취된 실험곤충 암컷 25마리를 여지 위에 일렬로 배치한다.
- ⑥ 농도별로 준비된 살충제 희석액을 미량국소처리기에 취한 다음 (집)파리의 암컷 흉부배면에 0.5 μ l를 점적한다(모기 및 바퀴의 경우, 암컷의 흉부복면에 각각 0.25 μ l, 5 μ l를 점적). 이때

대조군은 아세트산을 처리하며, 대조군을 가장 먼저 실시하고 낮은 농도부터 실험곤충에 처리, 3 반복으로 실시한다. (주의 : 아세트산은 휘발성이 강해 실험곤충의 점적 시간이 늦어지면 주사기에서 나오는 약량이 적어진다. 그 때는 미량국소처리기의 핸들을 돌려 휘발된 바늘끝 약액을 제거하고 새로 나오는 약제에 실험곤충을 점적시킨다)

- ⑦ 처리 24시간 후 예비실험 결과를 조사하여 0%에서 100%의 치사율을 보이는 구간을 세분화하고, 총 5 구간의 본 시험구간을 설정한다.
- ⑧ 본 실험은 예비실험과 마찬가지로 대조군을 먼저 실시하고 실험곤충에 제시된 약량으로 처리, 최소 3 반복으로 실시한다.
- ⑨ 먹이로서 10% 설탕물을 탈지면에 흡수시킨 후, 약제농도가 기록된 청결한 종이컵(모기의 경우) 또는 비닐컵(파리, 바퀴의 경우)의 벽면에 붙이고, 점적된 실험곤충을 컵에 넣고 망사를 씌운다. 그리고 환기가 잘 되는 장소에 놓고 마취에서 깨어나도록 도움을 준다. 모기의 경우 비닐컵에 넣으면 정전기로 인하여 벽면에 달라붙는 경우가 있다.
- ⑩ 모든 실험이 끝나면 항온항습기(온도 25℃, 상대습도 75± 5%) 또는 항온실로 옮긴다.

<실험결과>

- ⑪ 24시간 후에 살충율을 조사하고, 각 농도마다의 평균 살충율을 산출한다. 가볍게 컵을 흔들어 확인하며 전혀 움직임이 없거나 경미한 움직임 또는 뒤집어서 이동이 거의 불가능한 곤충은 죽은 것으로 간주한다.
- ⑫ 대조군에서 죽은 개체가 보일 경우 Abbott 공식을 이용하여

보정 살충율을 구한다.

$$\text{보정살충율}(\%) = \frac{\text{실험군의치사율}(\%) - \text{대조군의치사율}(\%)}{100 - \text{대조군의치사율}(\%)} \times 100$$

- ⑬ 대조군의 치사율이 10% 이상인 경우에는 다시 실험한다.
- ⑭ 각 시험 목적에 맞게 Probit analysis 프로그램(SAS 또는 SPSS 등)을 이용하여 반수치사약량(LD50) 또는 95%(LD95)나 99%(LD99) 치사약량 및 95% 신뢰한계를 구한다. 표시단위는 실험목적에 따라 약량(μg)/개체 또는 약량(mg)/체중(g) 등으로 나타낸다.
- ⑮ 저항성비(resistance ratio)를 구한다.

$$\text{저항성비} = \frac{\text{야외채집종성충에대한}LD_{50}\text{값}}{\text{감수성계통성충에대한}LD_{50}\text{값}}$$

[실험예]

1. 빨간집모기 감수성 계통과 야외 채집종의 암컷성충에 살충원제 A를 약량별로 처리하였을 때 다음과 같은 성적을 얻었다.

실험충	농도	마리수	살충율
감수성 계통			
	무처리		
야외 채집종			
	무처리		

- 2. 보정살충율을 구한다.
- 3. Probit analysis 프로그램을 이용하여 반수치사약량(LD50) 및 95%

신뢰한계를 구한다.

4. 저항성비를 구한다.

나. 침지처리법(Immersion test)

개 요 : 주로 모기유충에 대한 속효성 유기합성살충제, 곤충생장조절제와 같은 지효성 유기합성살충제, 또는 미생물 살충제의 효력시험 및 저항성 평가의 목적에 이용되고 있는 생물검정법이다. 시험액으로서 살충원제의 에탄올용액 또는 유제(乳劑), 유제(油劑), 수화제 등의 제제에 대해서 실시할 수 있다.

대상해충 : 모기 3령 유충 등

시험과정

<준비물>

- 장비 및 시험기자재
 - 냉장고(4℃).
 - 항온기(25℃) 또는 항온실(25℃)
 - 분석용 저울
 - 증류수 제조장치
- 초자 및 재료
 - 300ml 종이컵, 플라스틱컵 또는 비이커
 - 피펫(선단을 약간 넓힌 것이 편리)
 - 10ml 시험관(뚜껑을 돌려서 막을 수 있는 형태)
 - 100ml, 500ml 메스실린더
 - 25ml 종이컵, 플라스틱컵 또는 비이커(이하 유충컵으로 표시)

- 에탄올
- 계면활성제 Triton-X 100
- 증류수 또는 2~3일 이상 방치한 수돗물(수돗물에는 소독용 염소가 함유되어 있어 살충제의 종류에 따라서는 분해되는 경우가 있다.)
- 라벨

[1] 속효성 합성살충제

<시험액 준비>

- ① 살충제를 에탄올에 희석하여 1% 농도의 시험액 5ml를 만든다. 시험액을 10ml 시험관에 넣고 용매가 증발하지 않도록 마개를 한 다음 4℃ 냉장고에 보관한다.

<모기유충 준비>

- ② 표준감수성 계통 또는 실험실 계통 및 야외 채집종 또는 누대 사육 5세대 이하의 모기 3령 유충을 피펫에 취하여 25ml 유충 컵에 25마리씩 넣고 증류수 또는 수돗물로 20ml로 맞춘다. 3령 유충을 사용할 경우 침지시험 중에 번데기가 나오지 않는다.

<노출실험>

- ③ 1차로 예비실험을 위해 희석액을 만든다. 1% 시험액을 에탄올로 10배 희석하여 0.1% 10ml를 만들고, 같은 방법으로 0.001%, 0.0001%, 0.00001%의 시험액을 만든다.
- ④ 살충원제를 물에 잘 용해되도록 하기 위해 만든 1% Triton-X 100 수용액 230ml를 종이컵 또는 비이커(300ml)에 넣은 다음 상기 살충제 희석액 1ml씩을 넣고 고루 섞이도록 잘 저어준 다음 10mg/L의 농도로 먹이를 넣어준다. 대조군은 1%

Triton-X 100 수용액 230ml에 에탄올을 1ml를 첨가한다.

- ⑤ 상기 종이컵 또는 비이커에 ②항의 3령 유충 25마리를 넣어 주어 총 250ml로 한다. 3 반복으로 실시한다.
- ⑥ 처리 24시간 후 예비실험 결과를 조사하여 10~90%의 치사율을 보이는 구간을 세분화하여 총 5구간의 본 시험구간을 설정한다. 침지용 희석액의 농도 간격은 2배씩을 취하는 것이 보통이나 약제의 특성 또는 기타 이유로 간격을 좁히고 싶을 때는 1.4를 곱한 농도 간격으로 한다.
- ⑦ 18개(실험군 15개, 대조군 3개)의 종이컵 또는 비이커(300ml)에 상기 5단계 희석액을 ④항과 같이 처리한다.
- ⑧ 상기 종이컵 또는 비이커에 ②항의 3령 유충 25마리를 넣어 주어 총 250ml로 한다. 실험은 최소 3 반복으로 실시한다.
- ⑨ 모든 실험이 끝나면 항온기(25℃) 또는 항온실(25℃)로 옮긴 다음 10mg/L의 농도로 먹이를 넣어 준다.

<시험결과>

- ⑩ 24시간 후에 살충율을 조사하고, 각 농도마다의 평균 살충율을 산출한다. 용기 바닥에 가라앉아 부상하지 않는 빈사상태의 유충은 죽은 것으로 한다. 생사의 판정에는 침금 등을 이용한다.
- ⑪ 대조군에서 죽은 개체가 보일 경우 Abbott 공식을 이용하여 보정살충율을 구한다.

$$\text{보정살충율(\%)} = \frac{\text{실험군의치사율(\%)} - \text{대조군의치사율(\%)}}{100 - \text{대조군의치사율(\%)}} \times 100$$

- ⑫ 대조군의 치사율이 10% 이상인 경우에는 다시 실험한다.
- ⑬ 각 시험 목적에 맞게 Probit analysis 프로그램(SAS 또는 SPSS

등)을 이용하여 반수치사농도(LC50) 또는 95%(LC95)나 99%(LC99) 치사농도 및 95% 신뢰한계를 구한다.

⑭ 저항성비(resistance ratio)를 구한다.

$$\text{저항성비} = \frac{\text{야외채집종유충에 대한 } LC_{50}\text{값}}{\text{감수성계통유충에 대한 } LC_{50}\text{값}}$$

[실험예]

침지처리법의 실험예는 다음과 같은 방식으로 진행된다.

1. 빨간집모기 감수성 계통과 야외 채집종의 3령 유충에 살충제 A 10% 유제(乳劑)를 농도별로 처리하였을 때 다음과 같은 성적을 얻었다.
2. 보정살충율을 구한다.
3. Probit analysis 프로그램을 이용하여 반수치사농도(LC50) 및 95% 신뢰한계를 구한다.
4. 저항성비를 구한다.

[2] 지효성 합성살충제

<시험액 준비>

- ① 생장조절제를 에탄올에 희석하여 1% 농도의 시험액 5ml를 만든다. 시험액을 10ml 시험관에 넣고 용매가 증발하지 않도록 마개를 한 다음 4℃ 냉장고에 보관한다.

<모기유충 준비>

- ② 표준감수성 계통 또는 실험실 계통 및 야외 채집종 또는 누대 사육 5세대 이하의 모기 3령 유충을 피펫에 취하여 25ml 유충

컵에 25마리씩 넣고 증류수 또는 수돗물로 20ml로 맞춘다. 3령 유충을 사용할 경우 침지시험 중에 번데기가 나오지 않는다.

<노출실험>

- ③ 1차로 예비실험을 실시한다. 1% 시험액을 에탄올로 희석하여 10ppm, 1ppm, 0.1ppm, 0.01ppm, 0.001 ppm의 시험액을 만든다.
- ④ 생장조절제의 원제를 물에 잘 용해되도록 하기 위해 만든 1% Triton-X 100 수용액 230ml를 종이컵 또는 비이커(300ml)에 넣은 다음 상기 살충제 희석액 1ml 씩을 넣고 고루 섞이도록 잘 저어준다. 대조군은 1% Triton-X 100 수용액 230ml에 에탄올을 1ml를 첨가한다.
- ⑤ 상기 종이컵 또는 비이커에 ②항의 3령 유충 25마리를 넣어 주어 총 250ml로 한다. 항온기(25℃) 또는 항온실(25℃)로 옮긴 다음 일정기간 방치한다. 2일 간격으로 10mg/L의 농도로 먹이를 넣어 준다. 3반복으로 실시한다.
- ⑥ 시험 후 24시간 마다 치사된 유충 수, 용화된 번데기 수, 치사된 번데기 수를 기록한다. 유충이 모두 치사될 때까지 확인한다.
- ⑦ 번데기를 끄집어내어 별도의 깨끗한 컵이나 비이커에 옮긴 다음 우화수를 기록한다.
- ⑧ 예비실험 결과를 조사하여 10~90%의 우화율을 보이는 구간을 세분화하여 총 5구간의 본 시험구간을 설정한다. 침지용 희석액의 농도간격은 2배씩을 취하는 것이 보통이나 약제의 특성 또는 기타 이유로 간격을 좁히고 싶을 때는 1.4를 곱한 농도 간격으로 한다.
- ⑨ 18개(실험군 15개, 대조군 3개)의 컵 또는 비이커(300ml)에 상

기 5단계 희석액을 ④항과 같이 처리한다.

- ⑩ 상기 컵 또는 비이커에 ②항의 3령 유충 25마리를 넣어 주어 총 250ml로 한다. 실험은 최소 3반복으로 실시한다.
- ⑪ 모든 실험이 끝나면 항온기(25℃) 또는 항온실(25℃)로 옮긴 다음 2일 간격으로 10mg/L의 농도로 먹이를 넣어 준다.
- ⑫ 시험 후 24시간 마다 치사된 유충 수, 용화된 번데기 수, 치사된 번데기 수를 기록한다. 유충이 모두 치사될 때까지 확인한다.
- ⑬ 번데기를 꼬집어내어 별도의 깨끗한 컵이나 비이커에 옮긴 다음 우화수를 기록한다.

<시험결과>

- ⑭ 대조군의 유충 치사율이 10% 이상인 경우에는 재 실험한다. 용화율, 우화율에 대해 각각 반수유효약량(Effective Dose, ED50) 및 우화억제율(emergence inhibition, IE)을 구한다.

$$\text{우화억제율 } IE(\%) = 100 - \left(\frac{T \times 100}{C} \right)$$

T = 처리군에서의 생존율(%) 또는 우화율(%)

C = 대조군에서의 생존율(%) 또는 우화율(%)

- ⑮ 각 시험 목적에 맞게 Probit analysis 프로그램(SAS 또는 SPSS 등)을 이용하여 반수유효약량(ED50) 또는 95%(ED95)나 99%(ED99) 유효약량 및 95% 신뢰한계를 구한다.
- ⑯ 저항성비(resistance ratio)를 구한다.

$$\text{저항성비} = \frac{\text{야외채집종유충에 대한 } ED_{50} \text{ 값}}{\text{감수성계통유충에 대한 } ED_{50} \text{ 값}}$$

[3] 미생물 살충제

<시험액 준비>

- ① 박테리아성 살유충제의 성분함량(%)을 고려하여 수돗물 또는 증류수에 1% 용액이 되도록 희석하여 시험액을 만든다. 박테리아성 살유충제는 물에 희석할 경우 변성되기 쉬우므로 실험할 때마다 시험액을 새로 제작한다.

<실험곤충 준비>

- ② 표준감수성 계통 또는 실험실 계통 및 야외 채집종 또는 누대 사육 5세대 이하의 모기 3령 유충을 피펫에 취하여 25ml 유충 컵에 25마리씩 넣고 증류수 또는 수돗물로 20ml로 맞춘다. 3령 유충을 사용할 경우 침지시험 중에 번데기가 나오지 않는다.

<노출실험>

- ③ 1차로 예비실험을 한다. 1% 시험액을 증류수 또는 수돗물로 10배로 희석하여 0.1% 시험액 10ml를 만들고, 같은 방법으로 0.001%, 0.0001%, 0.00001%의 시험액을 만든다.
- ④ 증류수 또는 수돗물 230ml를 종이컵 또는 비이커(300ml)에 넣은 다음 상기 살충제 희석액 1ml 씩을 넣고 고루 섞이도록 잘 저어준다. 대조군은 증류수 또는 수돗물 230ml에 물 1ml를 첨가한다.
- ⑤ 상기 종이컵 또는 비이커에 ②항의 3령 유충 25마리를 넣어 주어 총 250ml로 한다. 3 반복으로 실시한다.
- ⑥ 처리 24시간 후 예비실험 결과에 따라 10~90%의 치사율을 보이는 구간을 세분화하여 총 5구간의 본 시험구간을 설정한다. 침지용 희석액의 농도간격은 2배씩을 취하는 것이 보통이

나 약제의 특성 또는 기타 이유로 간격을 좁히고 싶을 때는 1.4를 곱한 농도 간격으로 한다.

- ⑦ 18개(실험군 15개, 대조군 3개)의 종이컵 또는 비이커(300ml)에 상기 5단계 희석액을 ④항과 같이 처리한다.
- ⑧ 상기 종이컵 또는 비이커에 ②항의 3령 유충 25마리를 넣어 주어 총 250ml로 한다. 실험은 최소 3 반복으로 실시한다.
- ⑨ 모든 실험이 끝나면 항온기(25℃) 또는 항온실(25℃)로 옮긴다.
- ⑩ 10mg/L의 농도로 먹이를 넣어 준다.

<시험결과>

- ⑪ 24시간 후에 살충율을 조사하고, 각 농도마다의 평균 살충율을 산출한다. 용기 바닥에 가라앉아 부상하지 않는 빈사상태의 유충은 죽은 것으로 한다. 생사의 판정에는 침금 등을 이용한다.
- ⑫ 대조군에서 죽은 개체가 보일 경우 Abbott 공식을 이용하여 보정살충율을 구한다.

$$\text{보정살충율}(\%) = \frac{\text{실험군의치사율}(\%) - \text{대조군의치사율}(\%)}{100 - \text{대조군의치사율}(\%)} \times 100$$

- ⑬ 대조군의 치사율이 10% 이상인 경우에는 재 실험한다.
- ⑭ 각 시험 목적에 맞게 Probit analysis 프로그램(SAS 또는 SPSS 등)을 이용하여 반수치사농도(LC50) 또는 95%(LC95)나 99%(LC99) 치사농도 및 95% 신뢰한계를 구한다.
- ⑮ 저항성비(resistance ratio)를 구한다.

$$\text{저항성비} = \frac{\text{야외채집종유충에대한}LC_{50}\text{값}}{\text{감수성계통유충에대한}LC_{50}\text{값}}$$

다. 배지혼입법

개 요 : 파리유충의 사육배지에 곤충생장조절제와 같은 지효성 유기 합성살충제를 혼입해서 우화율까지 조사함으로써 살충효력을 보는 방법으로 저항성 평가의 목적에도 이용되고 있다. 시험액으로서 살충원제의 에탄올 용액, 유제(乳劑), 유제(油劑), 수화제, 분제 등 각종 제제에 대해서 실시할 수 있다.

대상해충 : 파리 2령 유충

시험과정

<준비물>

- 장비 및 시험기자재
 - 냉장고(4℃).
 - 항온항습기(25℃) 또는 항온실(25℃)
 - 분석용 저울(실험약제 측정용) 및 일반저울(먹이 측정용)
 - 증류수 제조장치
- 초자 및 재료
 - 원통형 유리용기(지름 9cm, 높이 6cm)
 - 10 ml 시험관(뚜껑을 돌려서 막을 수 있는 형태)
 - 에탄올
 - 계면활성제 Triton-X 100
 - 증류수 또는 2~3일 이상 방치한 수돗물(수돗물에는 소독용 염소가 함유되어 있어 살충제의 종류에 따라서는 분해되는 경우가 있다.)
 - 라벨

<시험액 준비>

- ① 생장조절제를 에탄올로 희석하여 1% 시험액 5ml를 만든다. 시험액을 10ml 시험관에 넣고 용매가 증발하지 않도록 마개를 한 다음 4℃ 냉장고에 보관한다.

<파리유충 준비>

- ② 표준감수성 계통(SRS 계통 또는 CSMA 계통) 또는 실험실 계통 및 야외 채집종 또는 누대사육 5세대 이하의 파리 2령 유충을 50마리씩 용기에 담아 총 실험구간에 맞춰 준비한다.

<노출실험>

- ③ 1차로 예비실험을 실시한다. 1% 시험액을 에탄올로 희석하여 10ppm, 1ppm, 0.1ppm, 0.01ppm, 0.001ppm의 시험액을 만든다.
- ④ 먹이 50g을 달아 시험구간과 반복시험 수에 따라 유리용기에 담아 둔다.
- ⑤ 증류수 50ml에 생장조절제 5개 희석액 1ml 씩을 첨가하고 먹이 50g에 넣어 둔 다음 고루 섞이도록 잘 혼합한다. 대조군은 에탄올 1ml를 넣어준다.
- ⑥ 상기 먹이에 파리유충 50마리씩을 넣고 유충이 기어 나오지 못하도록 유리용기에 망을 씌워둔 다음 항온기(25℃) 또는 항온실(25℃)에 7일간 방치한다. 3 반복으로 실시한다.
- ⑦ 7일 후에 번데기를 끄집어내어 그 수를 기록하고, 번데기를 별도의 깨끗한 용기에 옮긴 다음 7일 후에 우화수를 기록한다.
- ⑧ 예비실험 결과를 조사하여 10~90%의 우화율을 보이는 구간을 세분화하여 총 5구간의 본 시험구간을 설정한다. 희석액의 농도간격은 2배씩을 취하는 것이 보통이나 약제의 특성 또는

기타 이유로 간격을 좁히고 싶을 때는 1.4를 곱한 농도 간격으로 한다.

- ⑨ 18개의 유리용기(실험군 15개, 대조군 3개)에 먹이 50g을 담아 둔 다음 상기 5단계 희석액을 ⑤항과 같이 처리한다.
- ⑩ 상기 약제 처리된 먹이에 파리유충 50마리씩을 넣고 유충이 기어 나오지 못하도록 유리용기에 망을 씌워둔 다음 항온기(25℃) 또는 항온실(25℃)에 7일간 방치한다. 실험은 최소 3반복으로 실시한다.
- ⑪ 7일 후에 번데기를 끄집어내어 그 수를 기록하고, 번데기를 별도의 깨끗한 페트리디쉬에 옮긴 다음 7일 후에 우화수를 기록한다.

<시험결과>

- ⑫ 대조군의 유충 치사율이 10% 이상인 경우에는 재 실험한다.
- ⑬ 용화율, 우화율에 대해 각각 반수유효약량(Effective Dose, ED50) 및 우화억제율(emergence inhibition, IE)을 구한다.

$$\text{우화억제율 } IE(\%) = 100 - \left(\frac{T \times 100}{C} \right)$$

T = 처리군에서의 생존율(%) 또는 우화율(%)

C = 대조군에서의 생존율(%) 또는 우화율(%)

- ⑭ 각 시험 목적에 맞게 Probit analysis 프로그램(SAS 또는 SPSS 등)을 이용하여 반수유효약량(ED50) 또는 95%(ED95)나 99%(ED99) 유효약량 및 95% 신뢰한계를 구한다.
- ⑮ 저항성비(resistance ratio)를 구한다.

$$\text{저항성비} = \frac{\text{야외채집종유충에 대한 } ED_{50} \text{ 값}}{\text{감수성계통유충에 대한 } ED_{50} \text{ 값}}$$

**양모제 효력평가지험법
가이드라인**



I. 서 론	95
II. 동물시험법	96
1. C57BL/6 마우스를 이용한 평가	98
가. 생장기 유도 효과 평가	98
나. 퇴행기 억제 효과 평가	99
2. SKH-1 무모마우스 또는 누드마우스를 이용한 평가 ..	100
III. 임상시험법	101

탈모증은 사춘기 이후 성인에서 시작되는 비교적 흔한 질환 중의 하나로써 생활 수준의 향상과 피부 미용에 대한 사회적인 관심이 증대됨에 따라 점차적으로 그 치료와 예방책에 대한 관심도 높아지고 있는 질환이다. 탈모관련 시장은 매년 큰 폭으로 성장하고 있으며 환경적인 요인과 더불어 현대인의 스트레스로 인한 젊은 층의 두피문제가 심각해지면서 현 탈모시장은 남녀노소를 불문하고 전 연령층으로 확대되고 있는 실정이다.

탈모의 원인에는 유전적 요인, 잘못된 식생활, 스트레스, 지루성 비듬, 내분비 이상 등이 알려져 있으며 탈모의 치료 및 예방을 위해 탈모 방지 및 양모를 목적으로 하는 제품의 사용이 증가하고 있다.

‘탈모 방지 및 양모’의 효능을 갖는 제품은 의약외품으로서 식약청에서 품목별로 안전성 및 효능을 심사하여 허가하고 있다.

이에 따라 본 가이드라인은 탈모 방지 및 양모의 효능을 평가하는 시험법을 표준화하여 관련 업계 및 심사자에게 도움을 주고 우수한 양모제의 개발 및 소비자 보호에 기여할 것으로 기대된다.

사람과 동물의 모발에는 모발 주기가 있다. 성장기(anagen phase)에는 모낭의 기저부위, 즉 모구에서 세포분열이 활발히 이루어져 모발이 계속 자라게 된다. 퇴행기(catagen phase)에는 모구가 급속도로 위축되며 모낭의 성장활동이 정지되어가고 휴지기(telogen phase)에는 모낭의 성장활동이 완전히 정지되게 된다. 그리고 휴지기 모낭의 기저부에서는 새로이 성장기 모발이 형성되게 되며 기존의 휴지기 모발은 새로운 성장기 모발에 의하여 밀려나 탈락되거나 또는 빗질 등의 기계적 작용에 의하여 빠지게 된다.

마우스를 이용한 동물시험에서는 휴지기에서 성장기로의 전환을 촉진시키는 효과(성장기 유도 효과)와 성장기에서 퇴행기로의 전환을 지연시키는 효과(퇴행기 억제 또는 성장기 연장 효과)를 확인함으로써 양모의 효력을 평가할 수 있다. 사람의 모발은 개개의 모발의 모발 주기가 다 다르지만 마우스의 경우에는 초기에는 모든 모발이 동일한 모발 주기에 있으며 또한 인위적인 방법으로 모발 주기를 동일하게 맞출 수 있어 모발 주기 변화를 보는 실험에 유용하다.

동물시험에 이용되는 마우스로는 C57BL/6 마우스, C3H 마우스, SKH-1 무모마우스, 누드 마우스 등이 있으며 주로 이용되는 C57BL/6 마우스는 색소를 만드는 멜라닌세포가 표피에는 존재하지 않고 모낭에만 존재하기 때문에 모낭의 멜라닌색소의 양에 의해 피부색이 결정되는 특성을 가지고 있다. 모낭에서의 멜라닌색소 합성은 성장기에만 이루어지기 때문에 성장기에는 피부색이 검은

색이 되고 멜라닌 색소 합성이 되지 않는 퇴행기 및 휴지기에는 피부색이 분홍색이 된다. 이와 같은 특성을 이용하여 피부 조직검사를 하지 않고도 피부색을 통해 모발 주기를 확인할 수 있는 장점이 있다. 또한 C57BL/6 마우스는 생후 6~7주령이 되면 대부분의 털이 모두 휴지기가 되며 피부색은 분홍색이 된다. 또한 휴지기 상태의 모발을 동시에 뽑아서 제거하면 모든 모발을 동시에 성장기로 전환시킬 수 있다.

생장기 유도 효과를 평가하기 위해서는 휴지기 상태인 생후 6~7주령의 C57BL/6 마우스의 등의 털을 깎은 후에 시험물질을 수주간 처리하면서 피부색의 변화를 관찰하여 생장기 유도 정도를 평가하게 된다.

퇴행기 억제 효과를 평가하기 위해서는 휴지기 상태인 생후 6~7주령의 C57BL/6 마우스의 모발을 뽑아서 생장기를 유도한 후 텍사메타손과 같은 퇴행기 유도 약물과 시험물질을 처리하면서 피부색의 변화를 관찰하여 퇴행기 억제 정도를 평가하게 된다.

그 외에 **SKH-1 무모 마우스**는 유전적인 결함에 의해 생후 첫 번째 모발 주기 동안 대부분의 모발이 소실된다. 그러나 일부 모낭은 정상적인 조직학적 구조를 보이며 남아있다. **누드 마우스**도 유전적인 결함에 의해 모낭은 존재하나 모낭세포의 최종 분화 장애로 모발 성장이 조기에 중단되고 퇴행기가 유도되어 정상적인 모발이 육안으로 관찰되지 않는다. 무모 마우스와 누드 마우스를 이용하면 모발을 깎거나 뽑지 않고도 모발의 성장 상태를 육안으로 관찰할 수 있고 털을 깎거나 뽑는 동안에 발생할 수 있는 피부 손상을 방지할 수 있는 장점이 있다.

1. C57BL/6 마우스를 이용한 평가

가. 생장기 유도 효과 평가

1) 시험방법

- ① 등의 피부색이 흰색 또는 분홍색인 6~7주령 암컷 C57BL/6 마우스를 사용한다.
- ② 시험군은 음성대조군(유효성분이 없는 기제 포함)과 양성대조군을 포함하여 2군 이상으로 하며 각군에는 6마리 이상의 마우스를 사용한다.
- ③ 전기면도기를 이용하여 마우스 등의 털을 깎고 털을 깎은 부위에 하루 1회 또는 2회씩 3~4주간 시험물질을 도포한다.
- ④ 시험기간 중에 가능하면 마우스가 등에 바른 시험물질을 핥아먹지 못하도록 하기 위한 조치를 하도록 한다.

2) 결과분석

- ① 전체 삭모 부위 중 생장기 모발이 자란 부위의 비 (전체 삭모 부위 면적 중 검정색 변한 면적의 비)를 구한다. 이를 시험 종료까지 매주 측정한다.
- ② 전체 삭모 부위 중 털이 자란 부위의 비를 측정한다. 시험 종료 시까지 매주 측정한다.
- ③ 시험 종료 시 또는 그 전 특정 시점에 조직검사를 시행하여 생장기 모낭의 형성 여부를 평가한다.
- ④ 그 외에 전문 논문에서 검증된 방법을 이용한다.

나. 퇴행기 억제 효과 평가

1) 시험방법

- ① 등의 피부색이 흰색 또는 분홍색인 6~7주령 암컷 C57BL/6 마우스를 사용한다.
- ② 시험군은 음성대조군(유효성분이 없는 기제 포함)과 양성대조군을 포함하여 2군 이상으로 하며 각군에는 6마리 이상의 마우스를 사용한다.
- ③ 마우스의 등의 털을 제거한다.
- ④ 제모 7일 후부터 제모한 부위에 하루 1회 또는 2회씩 7일간 시험물질을 도포한다.
- ⑤ 제모 9일 후부터 프로필렌글리콜을 용매로 사용한 0.1% 텍사메타손 1ml를 제모한 부위에 하루 1회씩 5일간 도포한다.
- ⑥ 시험기간 중에 가능하면 마우스가 등에 바른 시험물질을 핥아먹지 못하도록 하기 위한 조치를 하도록 한다.

2) 결과분석

- ① 제모 16일 후에 전체 제모 부위 중 생장기 모발이 유지되고 있는 부위의 비(전체 제모 부위 면적 중 피부색이 검정색인 면적의 비)를 구한다.
- ② 제모 16일 후에 조직검사를 시행하여 생장기 모낭, 퇴행기 모낭, 휴지기 모낭의 비를 구한다.

2. SKH-1 무모마우스 또는 누드마우스를 이용한 평가

1) 시험방법

- ① 5~7주령의 SKH-1 무모마우스 또는 누드마우스를 이용한다.
- ② 시험군은 음성대조군(유효성분이 없는 기제 포함)과 양성대조군을 포함하여 2군 이상으로 하며 각군에는 6마리 이상의 마우스를 사용한다.
- ③ 시험물질을 하루 1회 또는 2회씩 3~4주간 도포한다.
- ④ 시험기간 중에 가능하면 마우스가 등에 바른 시험물질을 핥아먹지 못하도록 하기 위한 조치를 하도록 한다.

2) 결과분석

- ① 매주 모발의 길이와 수를 육안 관찰한다.
- ② 시험 종료 시 또는 그 전 특정 시점에 조직검사를 시행하여 모낭의 상태를 평가 한다.

1. 연구 형식

이중 맹검, 위약 대조, 무작위 배정을 원칙으로 한다.

2. 연구기간

16주 이상

3. 연구계획

0일째

- 탈모부위 두피에 1개의 점 문신을 시행하고 문신을 중심으로 포토트리코그램을 시행한다.
- 전체 사진을 촬영한다.

8주째

- 피험자 설문 및 사진 촬영에 의한 연구자의 육안평가를 시행한다.

16주째

- 피험자 설문 및 사진 촬영에 의한 연구자의 육안평가를 시행한다.
- 포토트리코그램을 시행한다

4. 연구대상

- ① 18~54세의 안드로겐성 탈모증으로 진단된 남녀
- ② Basic and specific (BASP) 분류에 의해 basic type은 M2 이상 또는 C2 이상 또는 U1 이상, specific type은 V1 이상 또는 F1 이상으로 진단된 남녀 안드로겐성 탈모증 환자
- ③ 연구기간 동안 특별한 모발용품이나 모발관리 및 조작을 하지 않을 환자
- ④ 연구기간 동안 동일한 머리모양을 유지할 환자

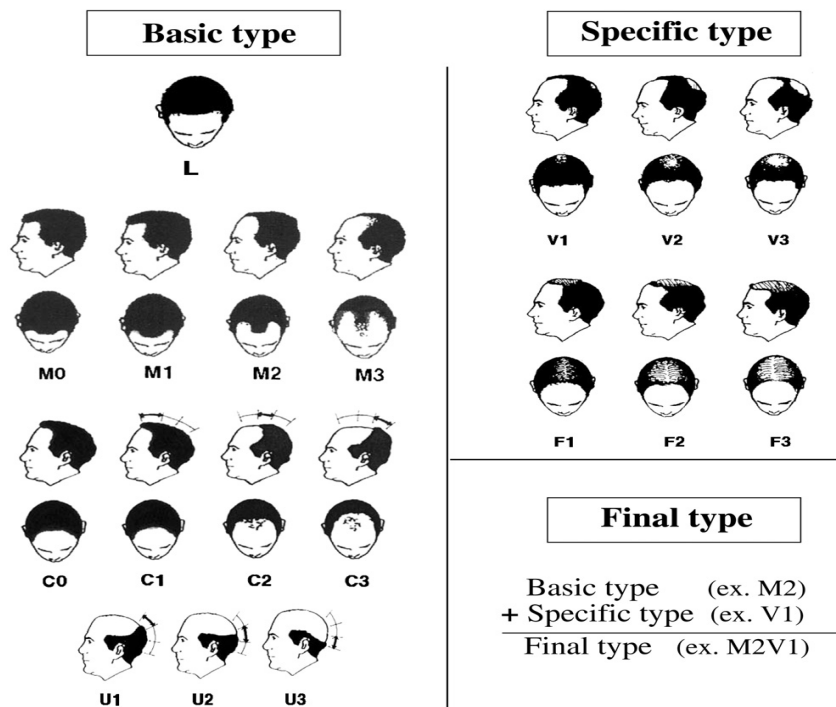


그림 1. BASP 분류

(Lee et al. A new classification of pattern hair loss that is universal for men and women: Basic and specific (BASP) classification. J Am Acad Dermatol 2007;57:37-46)

제외대상

- ① 최근 6개월 사이에 시험 결과에 영향을 줄만한 심각한 급성 신장 또는 심장 질환 또는 기타 만성 질환(고혈압, 당뇨 등)을 앓고 있는 자
- ② 임신 중이거나 수유 중 또는 6개월 이내에 임신을 계획하고 있는 자
- ③ 정신과적 질환이 있는 자
- ④ 감염성 피부 질환이 있는 자
- ⑤ 모발 이식술, 두피 축소술 등의 탈모에 대한 외과적 처치를 받은 적이 있는 자
- ⑥ 경구 Dutasteride를 사용한 적이 있는 자
- ⑦ 최근 1개월간 경구 Finasteride 를 복용하고 있는 자
- ⑧ 최근 1개월간 국소 발모제 및 양모, 육모제를 도포하고 있는 자
- ⑨ 최근 1개월간 다음 약물을 복용하고 있는 자: 스테로이드, 세포사멸제, 혈관 확장제, 항고혈압제, 항진간제, 베타수용체 차단제, 기관지 확장제, 이뇨제, spironolactone, cimetidine, diazoxide, cyclosporine, ketoconazole
- ⑩ 최근 1개월간 국소 스테로이드 제제를 두피에 도포하고 있는 자
- ⑪ 심한 지루성 피부염, 두피 건선, 두피 감염 등으로 시험 물질 도포에 지장이 있을 것으로 판단되는 자
- ⑫ 안드로겐성 탈모증 이외에 원형 탈모증, 휴지기 탈모증, 반흔성 탈모증 등의 다른 탈모 질환이 있는 환자
- ⑬ 기타 위의 사항들 외에 시험 책임자의 판단으로 시험수행이 곤란하다고 판단되는 자

5. 연구방법

1) 포토트리코그램(Phototrichogram)

평가하고자 하는 탈모부위에 직경 1mm의 작은 점 문신을 하거나 일정의 좌표를 기록하도록 하여 매번 점 문신 또는 일정좌표를 중심으로 하여 포토트리코그램을 시행한다.

- ① 전체 모발 수 (Total hair counts; number/cm²) : 1 cm² 원내에 있는 모발 수
- ② 모발 직경 (Hair diameter : μm) : 1 cm² 원내에 있는 모발 중 5개 모발의 평균 직경 값

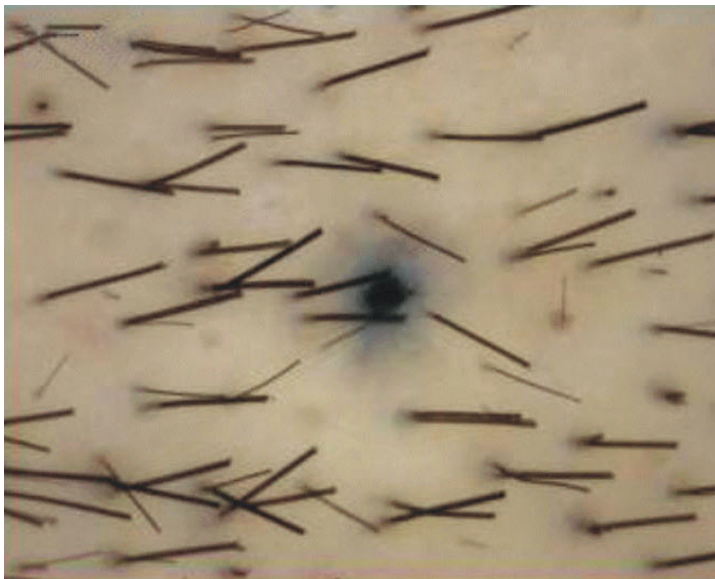


그림 2. 포토트리코그램 사진 촬영(예)

2) 피험자 설문

- 논문을 포함한 전문 자료를 근거로 한 적절한 설문 문항 사용

예>

- ① 정수리 부위의 모발이 풍성해 졌습니까?
- ② 탈락모발수가 줄었다고 생각하십니까?
- ③ 모발의 두께가 두꺼워졌다고 생각하십니까?
- ④ 앞 머리선이 좋아졌다고 느끼십니까?
- ⑤ 모발 성장 속도가 빨라졌다고 생각하십니까?

매우 좋아짐 +3, 좋아짐 +2, 조금 좋아짐 +1, 변화 없음 0

매우 나빠짐 -3, 나빠짐 -2, 조금 나빠짐 -1

3) 사진 촬영에 의한 연구자 평가

항상 같은 조건에서 정해진 위치에서 임상사진을 찍어 시험물질 도포 전과 후를 비교한다.

- 임상 사진 촬영 : 45도 (앞머리선), 90도 (정수리) 두 부위를 평가 시점마다 동일한 조건, 구도 및 위치에서 동일한 부위를 촬영한다.
- 사진 평가 : 연구자는 육안 평가를 실시한다.

예> 당신은 연구자로서 환자의 두피에서 머리카락이 빠지는 정도가 치료 전과 비교하여 어떠한가?

매우 좋아짐 +3, 좋아짐 +2, 조금 좋아짐 +1, 변화 없음 0

매우 나빠짐 -3, 나빠짐 -2, 조금 나빠짐 -1

4) 안전성 평가

평가시점마다 설문조사와 연구자의 관찰에 의해 주관적 자극감과 객관적 자극 등 두피 안전성을 평가

① 주관적 자극감

- 가렵다
- 바늘로 찌르듯이 아프다
- 화끈거린다
- 따끔거린다
- 뻗뻗하다

② 객관적 자극

- 홍반
- 부종
- 구진
- 기타

5) 유효성 평가 변수

(1) 1차 유효성 평가 변수(Primary efficacy endpoint)

① 포토트리코그램

- 총 모발 수
- 모발 두께

(2) 2차 유효성 평가 변수 (Secondary efficacy endpoint)

① 피험자 설문

② 사진 촬영에 의한 연구자 평가

6) 결과 평가 기준

1차 유효성 평가변수(Primary efficacy endpoint)에서 통계적으로 유의한 효과를 보여야 하며, 2차 유효성 평가 변수에서 이를 뒷받침할 수 있는 효과가 있어야 함