

## 생물시험법을 이용한 중금속 물질의 급성 및 피부독성 평가

조은혜 · 유선경 · 성화경 · 김은정 · 엄익춘<sup>†</sup> · 김필제

국립환경과학원

### Evaluating the *in vitro* Acute and Dermal Toxicity of Heavy Metals

Eunhye Jo, Sun kyoung Yoo, Hwa Kyung Sung, Eunjeong Kim, Igchun Eom<sup>†</sup>, and Pilje Kim

National Institute of Environmental Research, Incheon 22689, Korea

Received June 2, 2017/Revised June 8, 2017/Accepted June 20, 2017

Cadmium chloride(CdCl<sub>2</sub>), copper(II) chloride(CuCl<sub>2</sub>), potassium dichromate(VI)(K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>), zinc chloride (ZnCl<sub>2</sub>) and nickel(II) chloride(NiCl<sub>2</sub>) are found in a wide range of products. The purpose of this study was to determine the acute toxicity and skin irritancy of the five chemicals using *in vitro* systems, and compare the results with *in vivo* endpoints. In this study, BALB/c 3T3 cells were exposed to several concentrations of CdCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, and NiCl<sub>2</sub>, and the neutral red uptake (NRU) assay was used to analyze cell viability. In addition, the chemicals were applied to the EpiDerm human skin model (EPI-200) to determine which of them causes significant cytotoxicity. Compared with the UN GHS and EU risk phrases, the assay results exhibited a high prediction rate (100%) in the skin bioassay. In contrast, the acute toxicity bioassay results were more similar to the lethal dose, 50% obtained from rat experiments than GHS and R-phrases. In summation, these findings indicate that acute toxicity and skin irritancy bioassays can be utilized as an alternative to the use of animals in evaluating chemical toxicity.

**Key words:** Skin irritation, Acute toxicity, Heavy metals

### 1. 서 론

2016년 환경부에서 발간한 ‘미세먼지, 도대체 뭘까?’ 단행본에 따르면 미세먼지는 대부분 황산염, 질산염 등 대기오염물질이 공기 중에 반응하여 형성된 덩어리가 58.3%를 구성하고 있고 지표면 흙먼지 등에서 생기는 광물이 6.3%를 차지하고 있다. 또한 황사와 다르게 미세먼지는 산업시설, 자동차 배기가스 등에서 발생하여 중금속, 유해화학물질 등이 들어 있어 사람들의 건강에 영향을 줄 수 있어 주의해야 하고 미세먼지 중 카드뮴 등 중금속은 농작물, 토양, 수생생물에 피해를 줄 수 있다<sup>1)</sup>.

구리, 아연, 니켈 등 생명체에 필수적인 금속원소를 포함하여 중금속은 노출되는 양이 증가하게 되면 독성과 축적성이 높아 사람들의 건강에 치명적인 영향을 줄 수 있다<sup>2)</sup>. 지금까지의 환경보건정책을 살펴보면 다이옥신,

농약류 등 유기화학물질 관리에 집중되어 있었는데<sup>3)</sup> 앞으로 미세먼지 등 생활주변에서 쉽게 노출될 수 있고 축적성이 높아 위해성이 우려되는 중금속에 대한 관심이 요구되는 상황이다.

중금속의 유해성을 평가하는 방법은 전통적으로 설치류나 비설치류의 실험동물을 사용하여 영향을 보는 독성시험방법이 주로 사용되었으나 최근 동물의 희생을 줄이고 화학물질, 식품, 의약품 기구까지 안전성을 확인할 수 있는 동물대체시험법의 개발 및 활용 필요성이 대두되고 있다. 이런 움직임은 이 등에 의하여 농약, 내분비계장애물질 등 화학물질의 영향연구를 yeast estrogen assay, 세포독성실험 등 실험동물을 사용하지 않고 평가할 수 있는 bioassay 활용성으로 확인되었다<sup>4)</sup>. 그러나 우리나라에서 동물대체시험법은 식품의약품안전처에서 화장품을 대상으로 가이드라인이 제일 먼저 제안되어 실

<sup>†</sup>To whom correspondence should be addressed.

질적으로 활발하게 활용되고 있지만 화학물질, 농약 분야에서는 아직 미미한 상태이다. 따라서 본 연구에서는 동물대체시험법인 bioassay 기법 중 마우스 유래의 섬유아세포인 3T3 세포를 사용하는 Neutral red uptake (NRU) assay와 인공적으로 배양되는 인체피부조직을 사용하는 *in vitro* 피부독성시험법이 중금속 물질의 급성 및 피부독성시험법으로 활용가능한지 평가하는 데 목적이 있다. 시험물질로는 주변에서 흔히 사용되고 독성이 적다고 알려진 구리, 아연, 니켈 3종과 매우 유독하다고 알려진 카드뮴, 크롬 2종을 선정, 총 5종에 대하여 실험을 수행하고 기존의 동물시험 결과의 endpoint와 비교, 분석하였다.

미국국립보건원(NIH)의 독성학정보(toxnet)의 인체영향 보고서에 따르면 구리는 평균적으로 0.9~2.2 mg/day 정도 노출되는데 대부분 경구경로이고 특수한 경우를 제외하고 거의 인체에 영향이 없으나 눈과 피부에 자극성이 보고되었다. 아연의 경우 흡입노출에 의한 영향이 사례연구가 많고 피부자극은 보고된 적이 없다. 니켈 또한 피부자극 및 치명적인 독성사례는 없었다. 그러나 카드뮴과 크롬은 모두 국제암연구소(IARC)에서 지정된 Group 1 인체발암 확인물질로, 카드뮴은 작업자들이 단기간 노출되었을 때 피부의 육신거림, 1도 화상 등이 발생하였고 크롬은 피부의 심각한 자극을 유발하였다<sup>5)</sup>.

따라서 본 연구에서는 동물에 대한 생명윤리문제로 필요성이 급증하고 있는 bioassay를 이용하여 중금속 물질 5종에 대한 급성 및 피부독성을 평가하여 향후 화학물질의 유해성을 확인하는데 검증자료로 제시함으로써 유해 화학물질을 저비용, 고효율적으로 평가할 수 있는 기반을 구축하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 시험물질

시험 대상물질은 Cadmium chloride(CAS No. 10108-64-2), Copper(II) chloride(CAS No. 7447-39-4), Potassium dichromate(VI) (CAS No. 7778-50-9), Zinc chloride(CAS No. 7646-85-7)과 Nickel(II) chloride(CAS No. 7718-54-9)로 Sigma-Aldrich Korea Ltd.에서 구매 사용하였고 시험 전 0.9% saline에 정해진 농도로 분산시켜 노출시켰다.

### 2.2. 급성독성을 평가하기 위한 생물시험법

*In vitro* 3T3 NRU assay는 *in vivo* 급성 광독성시

험 결과를 예측할 수 있는 것으로 알려져 OECD TG 432로 2004년에 제정되었다. 그러나 최근 유럽의 대체시험검증센터(ECVAM)은 급성경구독성에서 UN GHS 분류를 요구하지 않는 물질을 확인하기 위해, 즉 실험동물을 이용한 급성경구독성시험 전 예비단계로 3T3 NRU 시험을 권고하였다<sup>6)</sup>. 따라서 본 시험은 EU ECVAM에서 제시한 시험법과 식품의약품안전평가원의 화장품 동물대체시험법 가이드라인<sup>7)</sup>에 따라 수행되었다. 마우스 섬유아세포 세포주인 Balb/c 3T3(ACTT) 세포주를 10% FBS, 4 mM 글루타민, 페니실린(100IU), 스트렙토마이신이 포함된 세포배양액 DMEM(Gibco)에서 배양하였다. 시험물질을 노출시키기 하루 전 96-well 마이크로플레이트에 세포를  $1 \times 10^4$  cells/well 밀도로 분주하고 다음날 5종의 시험물질을 처리하였다. 48시간 후 PBS를 이용하여 세포를 세척하고 neutral red 배지 100  $\mu$ L를 첨가하여 세포배양기에 3시간동안 배양하였다. 물:에탄올:아세트산이 49:50:1로 구성된 추출액을 각 well에 첨가하여 세포로부터 neutral red가 용출되기 위해 20분동안 플레이트 교반기에 천천히 교반시켰다. 분광광도계를 사용하여 550 nm 파장에서 흡광도를 측정하였고(Tecan, USA) 시험물질 노출에 의한 세포 생존률은 아래와 같이 산출하였다.

세포의 상대 생존률(%) = [시험물질 노출군의 OD\* 값/음성대조물질 노출군의 OD값 평균] × 100

\*OD : Optical density

세포의 생존율이 50%로 감소되는 시험물질의 농도인 IC<sub>50</sub>은 농도별영향 곡선에 의한 GraphPad Prism 4 software를 이용하여 산출하였다<sup>8)</sup>.

### 2.3. 피부자극성을 평가하기 위한 생물시험법

인체피부모델을 이용한 *in vitro* 피부 자극성 시험으로 OECD TG 439 및 식품의약품안전평가원의 화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인(V)에 따라 EpiDerm™ human skin model(EPI-200)을 사용하여 5개 시험물질의 피부자극에 대한 영향을 평가하였다<sup>9)</sup>. 3차원 인공피부모델에 시험물질을 노출 후 MTT법을 이용하여 세포의 생존율을 측정함으로써 시험물질이 각질층을 통과하여 하층의 피부 조직에 세포손상을 유발하는지 관찰하였다. MetTek Co. (Ashland, Mass)의 프로토콜에 따라 10% FBS가 포함된 배양배지를 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 18시간동안 전배양 후 시험물질 처리 후 1

시간동안 노출시켰다. 노출 종료 후 MTT 1 mg/mL 용액을 넣고 3시간동안 배양 후 isopropanol로 침전산물을 추출, 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존률은 아래와 같이 산출하였다.

$$\text{시험물질의 상대 생존률(\%)} = [\text{시험물질의 OD 값} / \text{음성대조물질의 OD 값 평균}] \times 100$$

#### 2.4. 생물시험법 데이터 분석과 통계처리

모든 생물시험법은 세 번의 반복실험을 수행하였고 통계분석은(SPSS 18.0, SPSS Inc., USA)을 이용하였으며 유의수준은  $p < 0.05$ 로 설정하였다. 분석은 정규성을 가정하고 모수적인 일원분산분석(One-way ANOVA)을 적용하였다.

NRU 생물시험법으로 산출된 세포영향농도인  $IC_{50}$ 을 이용하여 예측 급성독성 반수치사농도인  $LD_{50}$ 을 구하기 위해 NICEATM/ECVAM 연구에서 사용된 아래의 모델에 대입하였다<sup>6)</sup>.

Weight regression model(질량회귀모델)

$$\text{LogLD}_{50} \text{ (mg/kg)} = 0.372\text{logIC}_{50} \text{ (\mu g/mL)} + 2.024$$

인체피부모델을 이용한 생물시험법으로 산출된 세포 생존률을 이용하여 피부자극성 물질과 비자극성물질을 구별하는 기준치는 아래와 같이 설정 예측하였다<sup>9)</sup>.

- 상대생존율이 50% 이하이면 GHS category 2에 해당하는 피부 자극성 물질
- 상대생존율이 50% 초과하면 GHS 범주 외에 해당하는 피부 비자극성 물질

두 개의 생물시험법으로 예측된 급성독성 및 피부 자극성 결과를 실제 실험동물을 이용한 독성결과값과 비교, 분석하기 위하여 OECD eChemportal에서 5개 중금속의 독성 참고치를 수집하였다<sup>10)</sup>.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 급성독성 생물시험법을 이용한 중금속 5종의 세포독성

Cadmium chloride, Copper(II) chloride, Potassium dichromate(VI) 및 Zinc chloride를 3T3세포에 1.5625, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu\text{M}$  노출 후 상대 세포생존율을 관찰하였더니 Fig. 1과 같이 농도의존적으로 생존율이 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. Nickel(II)

chloride의 경우 1.5625, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu\text{M}$ 의 농도에서 세포독성을 보이지 않아(data not shown) 노출농도를 10배 증가시켜 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000  $\mu\text{M}$  농도에서 노출 후 관찰한 세포생존율을 이용하여 상대 세포생존율을 구하였다(Fig. 1). 일부 저농도의 노출군을 제외하고 대부분의 노출군에서 유의적인 생존율 감소를 관찰할 수 있었다.

GraphPad Prism 4 software를 이용하여 각 물질 노출에 의해 세포가 50%가 감소된  $IC_{50}$ 농도를 구하였더니 Cadmium chloride, Copper(II) chloride, Potassium dichromate(VI), Zinc chloride 및 Nickel(II) chloride는 각각 0.32, 27.48, 11.85, 100.20, 267.30  $\mu\text{M}$ 이었다(Table 1). 산출된  $IC_{50}$ 의 수치는 몰농도로 NIH의 질량회귀모델을 이용하여 급성독성 endpoint인 반수치사량(mg/kg)을 구하기 위해서 분자량을 이용하여  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g}/\text{ML}$ )을 계산하였더니 각각 0.06, 3.69, 3.49, 13.66, 34.65로 나타낼 수 있었다. 따라서 5종의 시험물질 중 세포독성이 가장 높은 중금속은 Cadmium chloride이었고 가장 낮은 물질은 Nickel(II) chloride으로 판단되었다.

#### 3.2. 인체피부모델 생물시험법을 이용한 중금속 5종의 세포독성

5종의 시험물질을 인체피부조직에 적용 후 상대생존율을 관찰하였더니 Table 2와 같이 Cadmium chloride, Potassium dichromate(VI), Zinc chloride는 상대생존율이 50% 이상으로 관찰되었고 Nickel(II) chloride는 47.4%, Copper(II) chloride의 경우 12.4%로 가장 세포독성이 높은 것으로 판단되었다.

#### 3.3. 급성독성 생물시험법을 이용한 중금속 5종의 세포독성

5종의 중금속을 노출시킨 3T3세포의  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )으로 NIH의 질량회귀모델을 이용하여 급성경구 반수치사량 농도를 산출하였다(Table 3). 계산된 Cadmium chloride, Copper(II) chloride, Potassium dichromate(VI), Zinc chloride 및 Nickel(II) chloride의  $LD_{50}$ 은 각각 36.88, 171.85, 168.17, 279.47, 395.146 mg/kg으로 Cadmium chloride가 가장 낮았고 Potassium dichromate(VI), Copper(II) chloride, Zinc chloride, Nickel(II) chloride 순으로 높았다.

이를 화학물질의 분류, 표시에 대한 세계조화시스템인 UN GHS으로 분류된 각 시험물질의 표지와 비교하여

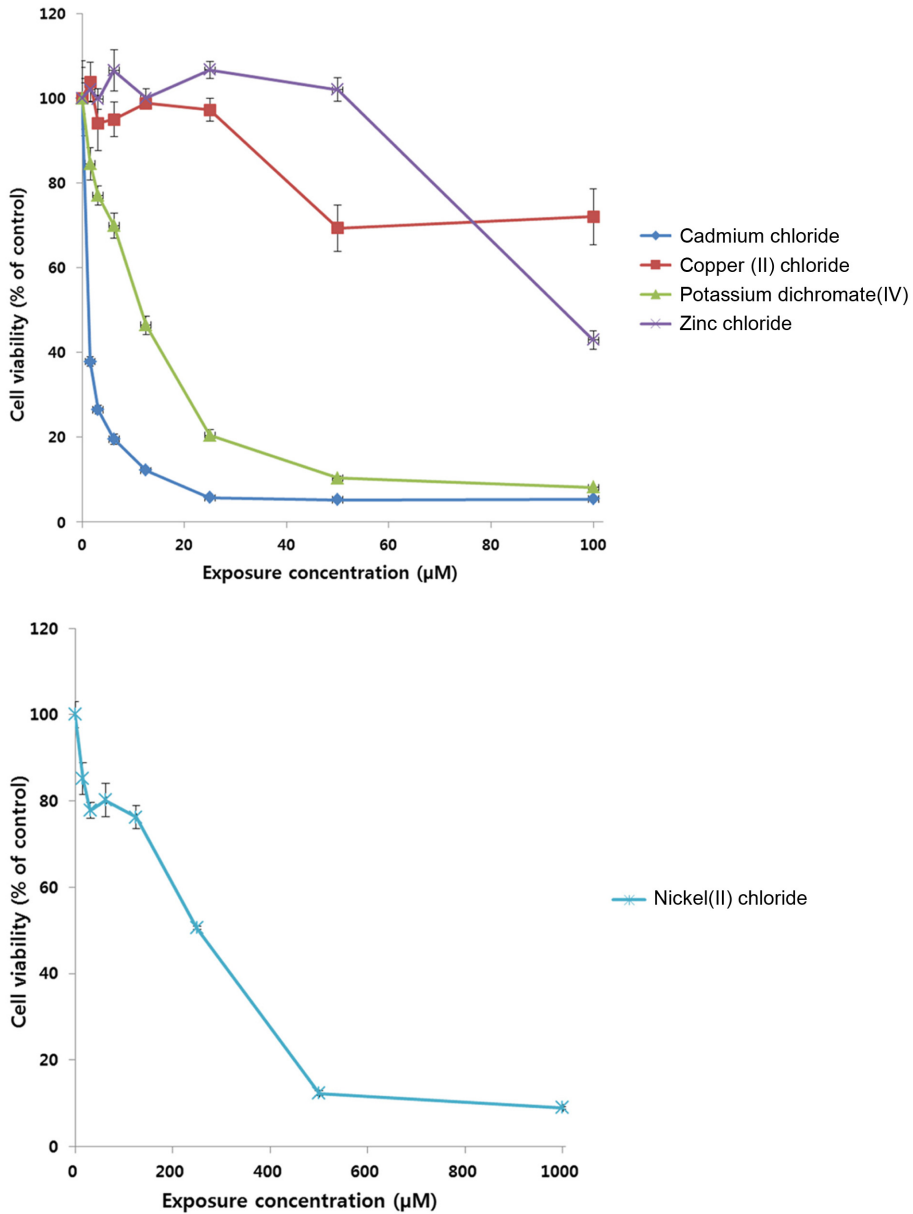


Fig. 1. Changes in viability of 3T3 cells exposed to CdCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, and NiCl<sub>2</sub>.

보면, Zinc chloride를 제외한 4종의 시험물질은 구분 3에 해당되어 급성경구독성 반수치사량의 범위가 50 mg/kg 초과 300 mg/kg 이하에 해당된다. Zinc chloride의 경우 구분 4로 분류 반수치사량의 범위가 300 mg/kg 초과 2,000 mg/kg 이하이다. Cadmium chloride, Nickel(II) chloride, Zinc chloride의 경우 생물시험법으로 예측된 독성수치와 실제 분류된 데이터 사이에는 크

지는 않지만 일정부분 차이가 발생하는 것을 알 수 있었다. 그러나 Copper(II) chloride, Potassium dichromate(VI)은 예측된 LD<sub>50</sub>의 수치가 실제 분류되어 있는 GHS 표지와 일치하였다.

유럽연합 위험규정인 EU Directive 67/548/EEC의 부속서 제3권 Risk Phrase에 따르면 Cadmium chloride, Copper(II) chloride, Potassium dichromate(VI) 및

**Table 1.** Inhibitory concentrations (50%) of heavy metals for 3T3 cells

Chemical	CAS No.	Purity	Molecule weight	IC <sub>50</sub> (mM)	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
Cadmium chloride	10108-64-2	100%	183.32	0.32	0.06
Copper(II) chloride	7447-39-4	97%	134.45	27.48	3.69
Potassium dichromate (IV)	10034-82-9	99.5%	294.19	11.85	3.49
Zinc chloride	7646-85-7	98+%	136.28	100.20	13.66
Nickel(II) chloride	7718-54-9	98%	129.62	267.30	34.65

**Table 2.** Comparison of *in vitro* and *in vivo* irritation testing data

	Relative survival (%)	Prediction	UN GHS	EU R-Phrase
Cadmium chloride	57.6±12.68	-	Classification not possible	-
Copper(II) chloride	12.4±1.30	Category 2	Category 2	R38 (Irritating to skin)
Potassium dichromate (VI)	58.7±12.11	-	Category 1A,B,C	-
Zinc chloride	49.9±6.49	-	Category 1A,B,C	-
Nickel(II) chloride	47.4±1.60	Category 2	Category 2	R38 (Irritating to skin)

**Table 3.** Comparison of variability of *in vitro* and *in vivo* LD<sub>50</sub>

Chemical	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	LD <sub>50</sub> (mg/kg)	Prediction	LD <sub>50</sub> of <i>in vivo</i> (mg/kg)	UN GHS	EU R-Phrase
Cadmium chloride	0.06	36.88		88 <sup>5,11)</sup>	Oral (Category 3)	R25 (Toxic if swallowed)
Copper(II) chloride	3.69	171.85		140 <sup>5,12)</sup>	Oral (Category 3)	R25
Potassium dichromate (VI)	3.49	168.17		25 <sup>5)</sup>	Oral (Category 3)	R25
Zinc chloride	13.66	279.47		350 <sup>5,11)</sup>	Oral (Category 4)	R22 (Harmful if swallowed)
Nickel(II) chloride	34.65	395.146		210 <sup>5)</sup>	Oral (Category 3)	R25

Nickel(II) chloride는 R25에 해당 삼켰을 경우 유독한 물질로 규정되어 있고 Zinc chloride는 R22 삼켰을 경우 위험한 물질로 분류되어 있다. 이는 GHS 분류결과와 비슷한 경향으로 생물시험법으로 예측한 급성경구독성 결과차이가 크지 않음을 나타내었다. 그러나, 각 물질에 대한 대표적인 랫드를 이용하여 구한 급성경구독성 LD<sub>50</sub> 수치와 비교하여 보면 Potassium dichromate (VI)를 제외한 4종의 중금속의 예측 독성값이 비슷한 양상을 보이는 것을 확인할 수 있었다.

이러한 결과들을 종합하여 보면 3T3 NRU 생물시험법은 급성경구독성의 endpoint인 LD<sub>50</sub>와 동일하지는 않지만 비슷한 범주 안에서 예측할 수 있다는 것을 알 수 있다. 급성경구독성은 화학물질등록평가법에 따라 2020년부터 0.1톤 이상 제조, 수입 시 제출하여야 하는 필수 자료로 향후 많은 수요가 증가할 것으로 예상된다. 급성경구독성은 시험물질의 예비 독성자료가 없을 경우 실험동물의 사용이 늘어나는 시험법을 이용하기 때문에 3T3 NRU 생물시험법을 활용하여 예측치를 추정 후 급성독성시험을 수행하게 된다면 기존의 시험법을 동물실

험의 사용을 최소화하고 더 신속하게 수행할 수 있을 것으로 판단된다.

### 3.4. 급성독성 생물시험법을 이용한 중금속 5종의 세포독성

EpiDerm™ human skin model(EPI-200)을 이용하여 각 시험물질의 상대생존율으로 피부 자극성과 비자극성을 예측한 결과 Copper(II) chloride와 Nickel(II) chloride은 50% 이하로 피부자극성물질로 판단되었다. Cadmium chloride, Potassium dichromate(VI)는 50% 초과로 피부자극성 범주 외 물질로 예측되었고 Zinc chloride의 경우 상대생존율이 49.9%이지만 표준편차가 6.49로 범주 외 물질로 판정하였다. 이러한 생물시험법으로 예측된 5종의 중금속 피부자극성 결과와 UN GHS 및 EU 위험규정과 비교하여 보면 Cadmium chloride, Potassium dichromate(VI)는 Category 2, R38인 자극성 물질로 동일한 결과를 나타내었다. Cadmium chloride도 동일하게 범주 외 물질로 분류되어 있었고 Potassium dichromate(VI), Zinc chloride는 Sub-category 1A, B,

C로 피부 부식성 물질에 해당되어 피부에 일부 독성은 있지만 자극성 물질은 아닌 것으로 분류되어 있었다.

인체피부조직을 이용한 피부자극성시험법은 2016년 국립환경과학원 화학물질 시험방법에 관한 규정으로 고시되었으나 화장품, 의약품 등에 비하여 활용이 적은 상황이다. 피부의 자극성/부식성 자료는 화학물등록평가법에 따라 1톤 이상 유통되는 화학물질에 대해 제출해야 하는 의무가 있어 향후 생물시험법의 활용이 확대될 예정이다. 따라서 본 시험연구의 결과는 앞으로 생물시험법을 이용하여 화학물질의 피부자극성을 평가하는데 기초자료로 활용될 수 있을 것이다.

#### 4. 결 론

새로운 화학물질의 개발과 사용이 증가함에 따라 의도적이든 비의도적이든 쉽게 인간에 노출되어 경구, 흡입, 피부독성 등을 야기할 수 있다. 화장품, 의약품의 경우 대체시험법의 활용이 활발하게 이루어지고 있으나 화학물질의 경우 기존의 동물실험과 같은 결과를 얻기가 쉽지 않고 대체시험법의 데이터 축적 및 인프라 부족으로 아직 도입이 확대되고 있지 않다.

본 연구에서는 3T3 NRU 시험법과 인체피부조직을 이용한 세포독성시험을 평가하여 생활환경에서도 쉽게 노출될 수 있는 카드뮴, 구리, 크롬, 아연 및 니켈 등 중금속 5종의 유해성을 확인하기 위한 새로운 방법으로 생물시험법의 적용성을 확인해 보았다. 급성경구독성의 경우 생물시험법의 예측값은 실험동물을 이용한 급성독성값과 유사한 결과를 확인하였고 피부자극성 생물시험법의 예측값은 실험동물을 이용한 결과와 일치하였다. 따라서 본 연구는 생물시험법을 이용하여 중금속을 비롯한 다양한 환경 중 화학물질의 급성경구독성과 피부자극성을 평가할 수 있는 근거를 마련하였다.

#### 참고문헌

1. 국립환경과학원, “미세먼지 도대체 뭘까?”, **2011**, 2-11.
2. M. Jaishankar, T. Tseten, N. Anbalagan, B. B. Mathew, and K. N. Beeregowda, “Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals”, *Interdisciplinary Toxicology*, **2014** 7, 60-72.
3. 박성호, 박지훈, 이정원, 방재현, 홍금용, 박선구, 이동권, “유해중금속 배출관리를 위한 다중 온라인 중금속 모니터링 시스템 개발”, *환경분석학회지*, **2014**, 17, 252-261
4. 이병진, 김수진, 윤준현, 김은주, N. C. Doung, 엄익춘, F. Shirashi, 최경희, “에스트로겐과 다이옥신 수용체 효모를 이용한 내분비계장애 영향 평가”, *한국환경분석학회지*, **2010**, 13, 109-115.
5. US National Institute of Health, <http://toxnet.nlm.nih.gov/>, June 2017.
6. EU Reference Laboratory for Alternative to Animal Testing, <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/>, June 2017.
7. 식품의약품안전평가원, “화장품 동물대체시험법 가이드라인”, **2012**, 5-10.
8. A. Kinsner-Ovaskainen, P. Prieto, S. Stanzel, A. Kopp-Schneider, “Selection of test methods to be included in a testing strategy to predict acute oral toxicity: an approach based on statistical analysis of data collected in phase 1 of the ACuteTox project”, *Toxicology in vitro*, **2013**, 27, 1377-1394.
9. 식품의약품안전평가원, “화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인(V)”, **2008**, 23-25.
10. OECD, <http://www.echemportal.org/echemportal/index.action>, June 2017.
11. R. J. Lewis, “Sax’s Dangerous Properties of Industrial Materials”, **2004**, 11th edition, 657, Wiley-Interscience, NJ.
12. WHO, “Environ Health Criteria 200: Copper”, **1998**, 101, INCHEM web site, US.