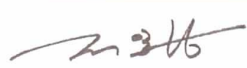


시험성적서

1. 성적서 번호 : CT14-086430
2. 의뢰자
 - 업체명 : 창영케미칼
 - 주소 : 충북 음성군 금왕읍 초금로 704-27
 - 의뢰일자 : 2014.08.18
 - 시험발급일 : 2014.10.13
3. 시험성적서의 용도 : 품질관리
4. 시료명 : NON-DOP Compound (TOTM)
5. 시험결과

- 첨부 페이지 참조 -

확인	작성자 성명	강상우	강상우	기술책임자 성명	강규일 
비고 : 1. 이 성적서는 의뢰자가 제시한 시료 및 시료명으로 시험한 결과로서 전체 제품에 대한 품질을 보증하지는 않습니다. 2. 이 성적서는 홍보, 선전, 광고 및 소송용으로 사용될 수 없으며, 용도 이외의 사용을 금합니다.					

한국건설생활환경시험연구원



성적서번호 : CT14-086430

< 붙임 >

세포독성시험

1. 개요

L-929 마우스 섬유아세포를 사용하여 시험물질의 세포독성 여부를 평가하는 방법이다.

2. 시험방법

ISO 10993-5:2009(E) Tests for *in vitro* cytotoxicity 중 Test on extracts method

3. 시료명

NON-DOP Compound (TOTM)

4. 시험일정 : 2014년 10월 07일 ~ 2014년 10월 10일

5. 시료조제

5.1 용출조건

5.1.1 용출용매 : Minimum Essential Medium(MEM) with 10% Fetal Bovine Serum(FBS)

5.1.2 용출온도/시간 : (37±1) °C/(24±2) h

5.2 시험물질

5.2.1 양성대조군 대조액 : 양성대조물질을 넣은 용출조건의 용출액

5.2.1.1 양성대조물질 : 0.1% ZDEC Polyurethane film

5.2.1.2 용출비율 : 120 cm²/20 mL

5.2.2 음성대조군 대조액 : 음성대조물질을 넣은 용출조건의 용출액

5.2.2.1 음성대조물질 : High-density polyethylene film

5.2.2.2 용출비율 : 120 cm²/20 mL

5.3.3 시험군 시험액 : 시료를 넣은 용출조건의 용출액

5.3.3.1 용출비율 : 4 g/20 mL

6. 시험재료

세포주 : L-929 마우스 섬유아세포(ATCC CCL1, NCTC Clone 929)

배양조건 : (5±1)% CO₂/(37±1) °C

성적서번호 : CT14-086430

< 붙임 >

7. 시험과정

7.1 세포파종

- 7.1.1 세포 현탁액을 준비하고, 혈구계수기를 이용하여 세포를 계수하였다.
- 7.1.2 1×10^5 cells/mL 비율로 희석하여 6-well plate(35Φ)에 2 mL/well로 분주하였다.
- 7.1.3 배양기에서 24시간 이상 배양하였다.

7.2 시험물질 처리

- 7.2.1 세포가 분주된 plate를 무균적으로 꺼내어 각각의 well을 도립현미경으로 관찰하여 시험에 적합한 plate를 선별하여 시험에 이용하였다.
- 7.2.2 각 well에 담겨 있는 배양배지를 제거 후 대조액 및 시험액을 well당 2 mL씩 처리하였다.
- 7.2.3 처리한 plate를 배양기에서 48시간 동안 배양하였다.

7.3 관찰 및 분석

7.3.1 정성분석

- 7.3.1.1 시험액, 음성대조액, 및 양성대조액을 처리한 각 well을 현미경 검경으로 관찰하였다.
- 7.3.1.2 세포형태, 액포형성, 약하게 부착하거나 세포부유, 세포용해, 세포막 파괴 등을 관찰하여 세포독성 판단기준에 따라 등급을 정하였다. 필요시 neutral red를 이용하여 염색 후 관찰하였다.

Grade	Reactivity	Conditions of all Cultures
0	None	Discrete intracytoplasmic granules ; No cell lysis, no reduction of cell growth.
1	Slight	Not more than 20 % of the cells are round, loosely attached, and without intracytoplasmic granules ; or show changes in morphology; occasional lysed cells are present; only slightly growth inhibition observable.
2	Mild	Not more than 50 % of the cells are round, devoid of intracytoplasmic granules, no extensive cell lysis; not more than 50 % growth inhibition observable.
3	Moderate	Not more than 70% of the cell layers contain rounded cells or are lysed; cell layers not completely destroyed, but more than 50 % growth inhibition observable.
4	Severe	Nearly complete destruction of the cell layers.

성적서번호 : CT14-086430

< 붙임 >

7.3.2 정량분석

7.3.2.1 현미경 검경이 끝난 후 각 well을 PBS를 이용하여 2회 이상 세척하였다.

7.3.2.2 Trypsin-EDTA 300~500 μ L 씩 각 well에 분주한 후 5~10분간 정치하였다.

7.3.2.3 부유된 세포를 15mL cornical tube에 모아 이 세포부유액을 등분산한 후 Hemacyto-meter를 이용하여 세포/1 mL를 개수하였다.

7.3.2.4 개수한 세포수로 Relative cell count[RCC (%)]값을 구하였다.

$$\text{※ RCC (\%)} = \frac{\text{Cell number of test group}}{\text{Cell number of negative control group}} \times 100$$

8 . 시험결과

8.1 정성분석 (표 1)

세포관찰 결과 시험액 0등급, 음성대조액 0등급, 용출용매 0등급 및 양성대조액 4등급으로 나타났다.

8.2 정량분석 (표 2)

RCC% 값은 시험액, 음성대조액, 및 용출용매를 처리한 well에서는 각각 100.0%, 100%, 100%가 나왔으며, 양성대조액을 처리한 well에서는 3.0% 가 나왔다.

9. 결 론

L-929 마우스 섬유아세포를 사용하여 NON-DOP Compound (TOTM) 및 양성, 음성대조군에 대한 세포독성시험을 수행한 결과, 양성 및 음성대조군의 시험결과는 유효한 결과를 나타내었다. 시험물질을 4 g/20 mL의 비율로 (37 \pm 1) $^{\circ}$ C에서 (24 \pm 2) 시간 동안 용출하였다. 용출 후 용출액을 시험액으로 사용하였다. 시험액은 L-929 세포에 48시간 동안 처리한 후 세포관찰 및 정량 · 정성분석을 하였다. 시험액의 세포독성 결과 정량분석 시 Relative Cell Count는 100.0 %로 나타났다. 정성분석 결과, 시험물질 처리군에서 cell rounding, 세포의 형태학적 이상 및 cell lysis는 관찰되지 않았다. 따라서, 본시험에 사용된 NON-DOP Compound (TOTM)의 용출액은 세포독성이 없는 것으로 판단되고, ISO 10993-5:2009의 세포독성 판단기준에 따른 세포독성 반응성은 0으로 판단된다.



시험성적서

성적서번호 : CT14-086430

< 붙임 >

표 1. 정성분석결과 (48시간 처리군)

	시험군(%)			용매대조군(%)			음성대조군(%)			양성대조군(%)		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Confluent Monolayer	100	100	100	100	100	100	100	100	100	5	5	5
Intracellular Granulation	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0	0	0
Rounding	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	5
Lysis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	90	90	90
Grade	0			0			0			4		

표 2. 정량분석결과 (48시간 처리군)

구 분 번호	세포계수 결과 (개 / mL)			
	시험군	용출용매	음성 대조군	양성 대조군
1	3.3×10^5	3.3×10^5	3.3×10^5	1.0×10^4
2	3.1×10^5	3.3×10^5	3.2×10^5	1.0×10^4
3	3.5×10^5	3.4×10^5	3.4×10^5	1.0×10^4
평균값	3.3×10^5	3.3×10^5	3.3×10^5	1.0×10^4
RCC (%)	100.0	100.0	100.0	3.0

표 3. 판정결과

구 분	시 험 액	대 조 액		
		용매대조	음성대조	양성대조
Grade	0	0	0	4

----- 이 하 여 백 -----