

KOSHA GUIDE

T - 22 - 2021

화학물질의 유전독성 평가를 위한 설치류 우성치사시험 지침

2021. 10.

한국산업안전보건공단

안전보건기술지침의 개요

- 작성자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 임 경 택
- 개정자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 임 경 택
- 개정자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 임 경 택

- 제·개정 경과
 - 2016년 10월 산업독성분야 제정위원회 심의(제정)
 - 2019년 11월 산업독성분야 기준제정위원회 심의(개정)
 - 2021년 09월 산업독성분야 기준제정위원회 심의(개정)

- 관련규격 및 자료
 - “Rodent Dominant Lethal Test”, OECD Guidelines for the testing of chemicals , Section 4 / Test No. 478, 29 Jul 2016

- 관련법규·규칙·고시 등
 - 산업안전보건법 제105조(유해인자의 유해성·위험성 평가 및 관리), 제108조(신규화학물질의 유해성·위험성 조사)
 - 산업안전보건법 시행규칙 제141조(유해인자의 분류기준), 제143조(유해인자의 관리 등)
 - 고용노동부 예규 제166호(화학물질의 유해성·위험성 평가에 관한 규정)
 - 국립환경과학원 고시 제2020-46호(화학물질의 시험방법에 관한 규정)

- 기술지침의 적용 및 문의
 - 이 기술지침에 대한 의견 또는 문의는 한국산업안전보건공단 홈페이지 (www.kosha.or.kr)의 안전보건기술지침 소관 분야별 문의처 안내를 참고하시기 바랍니다.
 - 동 지침 내에서 인용된 관련규칙 및 자료, 법규 등에 관하여 최근 개정본이 있을 경우에는 해당 개정본의 내용을 참고하시기 바랍니다.

공표일자 : 2021년 10월

제 정 자 : 한국산업안전보건공단 이사장

화학물질의 유전독성 평가를 위한 설치류 우성치사시험 지침

1. 목 적

이 지침은 산업안전보건법 제105조(유해인자의 유해성·위험성평가 및 관리), 제108조(신규화학물질의 유해성·위험성 조사), 산업안전보건법 시행규칙 제141조(유해인자의 분류기준), 제143조(유해인자의 관리)에 따라, 화학물질 유해성 평가를 위해 실험동물을 이용하여 실시하는 설치류 우성치사시험방법의 제안을 목적으로 한다.

2. 적용범위

이 지침은 산업안전보건법 제105조(유해인자의 유해성·위험성평가 및 관리), 제108조(신규화학물질의 유해성·위험성 조사), 고용노동부 예규 제166호(화학물질의 유해성·위험성 평가에 관한 규정) 및 국립환경과학원 고시 제2020-46호(화학물질의 시험방법에 관한 규정)에 의거 시험동물을 이용한 설치류 우성치사시험방법 및 결과의 작성에 적용한다.

3. 용어의 정의

(1) 이 지침에서 사용되는 용어의 정의는 다음과 같다.

(가) “황체(Corpora luteum 또는 corpora lutea)”란 난소에서 성숙하여 난자를 배출한 난소여포의 벽으로부터 형성한 progesterone을 분비하는 황색의 샘덩어리(glandular mass)를 말한다.

(나) “우성치사돌연변이(Dominant Lethal Mutation)”란 생식세포에서 발생하거나 수정 후 고정되는 돌연변이로 배아 또는 태아 사망의 원인이다.

(다) “생식율” 또는 “가임율(Fertility rate)”이란 짝짓기 한 암컷의 수 대비 교배임신된 암컷의 수를 말한다.

(라) “교배간격(Mating interval)”이란 노출의 끝과 처리군 암컷의 교배 사이 시간 간격을 말한다. 이 간격을 제어함으로써 상이한 생식세포 유형에 미치는 화학물질의 영향을 평가할 수 있다. 노출종료 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8주 동안 짝짓기한 마우스에서는 정자, 응축 정자, 원형 정자, 태사기 정모세포, 초기 정모세포, 분화된 정원세포, 분화중인 정원세포 및 줄기세포 정원세포에서의 영향을 측정한다.

(마) “최대허용용량(MTD)”이란 Maximum Tolerated Dose의 약자로서, 시험기간과 견주어 보아 시험을 제한하는 독성의 증거가 없으며(예를 들면 비정상적 행동이나 반응, 약한 체중 억제 또는 조혈기계의 세포독성), 폐사 또는 인도적 안락사를 요하는 통증의 증거, 고통 또는 괴로움이 없으면서 내성이 있는 가장 높은 용량을 말한다.

(바) “UVCB”란 Unknown or Variable Composition, Complex reaction products and Biological Materials의 약자로서, 정확한 화학구조와 분자구조를 알 수 없는 물질을 말한다.

(2) 그 밖의 용어의 뜻은 이 지침에서 특별히 규정하는 경우를 제외하고는 산업안전보건법, 같은 법 시행령, 같은 법 시행규칙, 고용노동부 예규 및 국립환경과학원 고시에서 정하는 바에 의한다.

4. 시험 개요

4.1 개요

4.1.1 OECD 가이드라인 478은 1984년도에 제정되었으며, 동 시험 지침은 발생, 생식독성 또는 유전독성시험과 같은 다른 독성시험들을 통합하는 30년 이상의 경험들을 반영하고 있다.

4.1.2 하지만 이 시험의 제한 및 많은 수의 동물들을 사용해야 하는 것은 원래 방법에서 의도되지 않았으며, 규제 요건에 대한 다른 대안이 없는 경우에만 사용할 수 있는 추가적인 시험방법으로 의도되었다.

4.1.3 통합된 독성시험은 독성시험에 사용하는 많은 수의 동물들을 절약하는 장점을 가지고 있다.

4.1.4 우성치사(Dominant Lethal, DL)시험의 목적은 화학물질에 의한 생식세포의 염색체 이상에 의한 돌연변이 생성 여부를 조사하기 위한 것이다. 더욱이 이 우성치사시험은 종에 따라 다를 수 있지만, 생체내 대사, 약물동력학 및 DNA 복구과정들이 활성화되고 반응에 기여함에 따라 유전독성을 평가하는 것과 관련이 있다. 시험물질에 노출된 후 DL 돌연변이가 유도됨은 그 화학물질이 시험동물의 생식조직에 영향을 미쳤음을 나타낸다.

4.1.5 우성치사 돌연변이는 배아 또는 태아사망을 일으킨다. 시험물질에 노출된 후 우성치사 돌연변이의 유도는 그 화학물질이 시험동물의 생식세포에 영향을 미쳤음을 나타낸다.

4.1.6 우성치사시험은 체세포 생체 내 종말점(end point)을 사용하는 시험의 양성 결과의 확인에 유용하고, 사람에서의 위험과 생식세포를 통해 전달되는 유전질환의 위험을 예측하기 위한 중요 종말점이다. 하지만 이 시험은 다수의 동물이 필요하고 노동 집약적이어서 결과적으로 수행하는 데 있어 매우 많은 비용과 시간이 필요하다.

4.1.7 자연발생적으로 일어나는 우성치사돌연변이의 빈도가 꽤 높으므로 돌연변이 빈도의 작은 증가의 검출을 위한 이 시험의 감도는 일반적으로 제한한다.

4.2 초기 고려사항

4.2.1 이 시험은 마우스가 가장 자주 사용되지만 랫드와 같은 다른 종들도 과학적으로 정당한 경우 적절한 일부 경우에 사용될 수 있다.

4.2.2 우성치사가 일반적으로 총 염색체 이상(구조적 및 수적 이상)의 결과이지만, 유전자 돌연변이는 배제될 수 없다.

4.2.3 생식세포 자체에서 일어나거나 초기 배아에서 수정 이후에 고정되는 우성치사 돌연변이는 배우자의 기능장애를 일으키지 않지만 수정란 또는 발생하고 있는 배아에 치명적이다.

4.2.4 수컷 각각은 적절한 간격으로 암컷과 순차적으로 교배한다. 처리에 따르는 교배의 수는 우성치사 시험의 궁극적 목적(5.3.9 (3))에 따라 달라지고 수컷 생식세포 성숙의 모든 단계가 우성치사를 평가하는데 확실해야 한다.

4.2.5 시험물질 또는 그 대사체(들)가 그 고환에 이르지 않을 것이라는 증거가 있으면 이 시험에서의 사용은 적절하지 않다.

5. 시험 방법

5.1 시험의 원리

5.1.1 일반적으로 수컷 동물은 적절한 노출 경로로 시험물질에 노출되었거나 노출되지 않은 미임신 암컷과 교배한다. 다른 생식세포 유형은 순차적 교배 간격을 이용하여 시험될 수 있다.

5.1.2 교배 후 그 암컷은 적절한 기간 후에 인도적 희생(안락사)되고, 착상 수와 배아의 생존 여부를 결정하기 위해 자궁을 검사한다.

5.1.3 시험물질의 우성치사율은 처리된 군에서 암컷 당 살아있는 착상과 매개물질/용매 대조군에서 암컷 당 살아있는 착상을 비교함으로써 결정한다. 대조군의 암컷당 죽은 착상과 비교하여 처리된 군에서 암컷 당 죽은 착상의 증가는 시험물질로 유도된 착상후 손실을 반영한다.

5.1.4 착상후 손실은 대조군에서 전체 착상 중 죽은 것의 비율에 비해 처리군에서 전체 착상 중 죽은 것의 비율을 결정함으로써 계산한다. 착상전 손실은 황체 수에서 전체 착상 수를 빼거나 처리군 및 대조군에서 암컷 당 전체 착상 수를 비교함으로써 추정될 수 있다.

5.2 실험 숙련도 검증

5.2.1 시험의 능력은 표 1에 열거된 것들과 같은 양성대조물질들(약한 반응 포함)을 포함하는 자료들로부터 우성치사를 발생시키는 능력을 보임으로써 검증되어야 하고, 가

5.2.1 능한 경우 매개물질 대조군 및 취득 음성대조군의 빈도가 자료의 허용 범위와 동일하거나 실험실의 과거 대조군 분포(Historical control distribution)를 재현함으로써 확립되어야 한다.

5.3 시험방법

5.3.1 동물 종의 선택

- (1) 실험에 일반적으로 사용되는 건강하고 젊은 성체 실험동물 계통을 사용해야 한다. 마우스가 적합하며, 랫드도 사용될 수 있다.
- (2) 과학적 증거가 보고된 경우 그 밖의 적합한 포유류 종을 사용할 수 있다.

5.3.2 동물 사육과 식이 조건들

- (1) 설치류의 경우, 동물실의 온도는 $22^{\circ}\text{C}(\pm 3^{\circ}\text{C})$ 이어야 한다. 비록 이상적인 상대습도가 50~60%이어야 하지만, 동물실 청소 중 이외에는 70%를 초과하지 않아야 한다.
- (2) 조명은 12시간 점등 12시간 소등되는 인공조명이어야 한다. 급식의 경우 식수의 무제한 공급과 더불어 기존의 실험실 식이를 사용할 수 있다. 식이의 선택은 이 경로로 투여될 때 시험물질의 적절한 혼합이 보장될 필요에 영향을 받을 수 있다.
- (3) 공격적인 행동이 예상되지 않으면 설치류는 같은 성별 및 처리군의 소그룹들(케이지 당 다섯 마리 이하)로 사육하여야 하고, 환경적으로 풍족한 단단한 바닥 케이지에서 사육되는 것이 바람직하다.
- (4) 실험동물들은 과학적으로 정당화된 경우에만 개별적으로 수용할 수 있다.

5.3.3 동물의 준비

- (1) 건강한 젊은 성체 실험동물이 일반적으로 사용되고, 대조군과 처리군으로 무작위적으로 할당한다.

- (2) 각각의 동물들은 인도적인 최소한의 침습적 방법(예 : 고리, 꼬리표, 마이크로-칩 또는 생체인식 가능, 귀 또는 발가락 천공은 불가)을 사용하여 고유 식별이 되고 적어도 5일 동안 실험조건에 적응시킨다.
- (3) 케이지는 위치에 가능한 영향을 최소화하는 방식으로 배열하여야 하고, 양성대조군과 시험물질에 의한 교차오염을 피해야 한다.
- (4) 연구의 시작 시 동물들의 체중 변이는 최소화하여야 하고 각 성별 체중의 $\pm 20\%$ 를 넘지 않아야 한다.

5.3.4 시험물질의 조제

- (1) 고체 시험물질은 실험동물에 투여하기 전에 적절한 용매 또는 매개물질에 용해 또는 현탁하거나 먹이나 음용수에 혼합해야한다. 액체 시험물질은 직접 투여하거나 투여 전에 희석할 수 있다.
- (2) 흡입노출의 경우 시험물질은 그 물리화학적 성질에 따라 가스, 증기 또는 고체/액체상 에어로졸로 투여될 수 있다.
- (3) 신선한 시험물질의 안정성 자료 확보와 적절한 저장조건을 확보하는 신선한 조제가 이루어져야 한다.

5.3.5 용매/매개물질

- (1) 용매/매개물질은 사용되는 용량수준에서 독성효과를 일으키지 않아야 하고, 시험물질과의 화학반응이 의심되지 않아야 한다. 만약 알려진 용매/매개물질을 사용하지 않는 경우는 이들의 호환성을 나타내는 참고 자료들을 지원하여야 한다.
- (2) 가능한 경우는 언제나 액상 용매/매개물질의 사용을 먼저 고려할 것을 권장한다. 일반적으로 사용되는 호환 용매/매개물질의 예로는 물, 생리식염수, 메틸셀룰로오스 용액, 카르복시메틸 셀룰로오스 나트륨염 용액, 올리브오일 및 옥수수유를 포함한다.

5.3.6 양성대조군

- (1) 최근(예, 최근 5년 이내)에 정기적으로 시험하였거나 시험에 사용되었던 실험실의 능력을 나타내지 않으면 동시에 수행되는 양성대조물질로 처리된 동물들이 반드시 사용되어야 한다. 하지만 시험물질을 투여받은 동물들과 같은 경로로 양성대조 동물들에 투여하거나 모든 교배 간격으로 시료채취할 필요는 없다.
- (2) 양성대조 물질은 시험에 사용된 조건에서 우성치사를 일으키는 것으로 알려진 것이어야 한다. 투여를 제외하고 대조군의 동물들은 처리군의 동물들과 동일한 방식으로 다루어야 한다.
- (3) 양성대조물질의 용량은 그 시험의 성능과 감도를 평가하기에 약하거나 적당한 효과를 나타내는 것으로 선택되어야 하지만, 양성 우성치사 효과를 일관적으로 나타내는 것이어야 한다. 양성대조물질의 예와 적절한 용량은 <표 1>에 나타났다.

<표 1> 양성대조물질의 예

물질명 (CAS 번호)	효과용량범위 (mg/kg) (설치류 중)	적용시간 (일)
Triethylenemelamine (51-18-3)	0.25 (마우스)	1
Cyclophosphamide (50-18-0)	50~150 (마우스)	5
Cyclophosphamide (50-18-0)	25~100 (랫드)	1
Ethyl methanesulphonate (62-50-0)	100~300 (마우스)	5
Monomeric Acrylamide (79-06-1)	50 (마우스)	5
Chlorambucil (305-03-3)	25 (마우스)	1

5.3.7 음성대조군

- (1) 음성대조군 동물은 용매 또는 매개물질 단독으로 투여되고 그렇지 않으면 투여군과 같은 방법으로 처리되어 매 샘플링 시간에 포함되어야 한다.
- (2) 우성치사가 없거나 선택된 용매/매개물질로 유도된 다른 유해 효과가 없는 과거 대조군 또는 보고된 대조군 자료가 없는 경우는 또한 매개물질 대조군의 수용가능성을 확립하기 위해 샘플링 시간에 포함되어야 한다.

5.3.8 동물의 수

- (1) 각각의 수컷들은 선호되는 한 마리의 미임신 암컷과 적합하게 미리 결정된 간격으로 (예, 주간 간격, 5.3.9 (1)(3)) 순차적으로 교배한다.
- (2) 군당 수컷의 수는 적어도 우성치사 빈도가 두 배가 되는 것을 검출하는데 필요한 통계력을 제공하기에 충분하도록 (각 교배 간격에서 교배 암컷의 수와 조합하여) 미리 결정해야 한다.
- (3) 교배 간격 당 암컷의 수는 또한 우성치사 빈도 (즉, 적어도 400개의 총 착상을 제공하기에 충분한 임신 암컷)를 검출하게 하는 통계 능력 계산으로 미리 결정되어야 하고 분석단위당 적어도 한 개의 죽은 착상(즉, 용량 당 교배군)이 예상되어야 한다.

5.3.9 투여 기간과 교배 간격

- (1) 투여에 따르는 교배 간격의 수는 투여 일정에 따라 좌우되고 수컷 생식세포 성숙의 모든 단계는 우성치사 유발을 평가하는지 확인해야 한다.
- (2) 단회 투여에서 매일 5회까지의 투여에서는 마지막 투여 후 일주일 간격으로 8회(마우스) 또는 10회(랫드) 교배해야 한다. 반복 투여의 경우에는 교배 간격의 수가 투여 간격의 증가에 비례하여 감소될 수 있지만, 정자형성의 모든 단계들(예, 28일 노출 후, 단지 4주간의 교배는 마우스에서 모든 단계의 정자형성을 평가하는 데 충분함)을 평가하는 목적을 유지한다.
- (3) 모든 투여와 교배 일정은 과학적 정당성이 있어야 한다.
- (4) 암컷은 적어도 한 번의 발정주기(예, 마우스와 랫드에서 모두 일주일 이 한 발정주기를 포함) 동안 수컷과 동거해야 한다. 일주일 간격 동안 교배하지 못한 암컷은 후속 교배 간격에 사용될 수 있다. 또는 질내 정자의 존재 혹은 질전의 존재로 교배를 확인할 때까지 동거시킨다.
- (5) 사용된 투여와 교배 방법은 우성치사 시험의 궁극적인 목적에 따라 달라진다. 주어진 화학물질이 우성치사 돌연변이 자체를 유도하는 지 결정하는 것이 목표라면, 그 인정된 방법은 정자형성 (예, 마우스의 경우 7주, 주당 5~7 투여)의 전체 주기로

투여되고 마지막에 한 번 교배한다. 하지만 우성치사 유도에 민감한 생식세포를 확인하는 것이 목표라면 단회 또는 5일 투여 후 일주일간격의 교배가 바람직하다.

5.3.10 용량 수준

- (1) 만일 용량결정에 도움이 될 기존의 적절한 자료가 없어 예비시험을 하여야 할 경우, 그 예비시험은 같은 실험실에서 같은 종, 계통, 성의 동물을 이용하여, 본 시험에서 하는 것과 같은 투여방법으로 실시하여야 한다.
- (2) 그 시험은 최대허용용량(MTD)를 알아내는 것을 목표로 해야 하며, MTD는 다음과 같이 정의 한다. 시험기간과 견주어 보아 시험을 제한하는 독성의 증거가 없으며 (예를 들면 비정상적 행동이나 반응, 약한 체중 억제 또는 조혈기계의 세포독성), 폐사 또는 인도적 안락사를 요하는 통증의 증거, 고통 또는 괴로움이 없으면서 내성이 있는 가장 높은 용량이다.
- (3) 최고허용용량은 또한 교배 성공에 부정적인 영향을 주지 않아야 한다.
- (4) 낮은 비독성 용량(호르몬 및 유사분열 촉진 물질과 같은)에서 특정 생물학적 활성을 가지는 시험물질 및 독성동태학적 특성의 포화를 나타내는 화학물질은 용량 설정 기준에서 제외될 수 있고 경우에 따라서 평가되어야 한다.
- (5) 용량 반응 정보를 얻기 위해 완전한 시험은 음성대조군과 일반적으로 공비 2~4로 최소 3개 용량 수준을 포함해야 한다.
- (6) 만일 시험물질이 기존의 자료들에 근거하거나 용량 결정 시험에서 독성을 나타내지 않는다면 단일 투여의 가장 높은 용량은 체중 kg당 2,000 mg이어야 한다. 하지만 만약 시험물질이 독성을 유발한다면 MTD는 가장 높은 투여 용량 및 거의 또는 전혀 독성을 나타내지 않은 용량의 최대치부터 범위를 바람직하게 포함하는 것이어야 한다.
- (7) 비독성 물질인 경우, 14일 이상의 투여기간 동안 제한 용량은 일일 체중 kg당 1,000 mg이어야 하고, 14일 미만의 투여기간 동안은 매일 체중 kg당 2,000 mg이어야 한다.

5.3.11 투여 방법

- (1) 사람에서 예상되는 노출 경로는 시험법을 설계할 때 고려되어야 한다. 따라서 식이, 식수, 피하, 정맥 주사, 국소, 흡입, 경구(위삽관에 의한), 또는 착상과 같은 노출의 경로들은 정당해야 선택될 수 있다.
- (2) 어떤 경우에도 그 경로는 대상 조직(들)에 적절한 노출을 보장하기 위해 선택되어야 한다. 복강 내 주사는 사람에의 노출에 의도된 것이 아니므로 일반적으로 바람직하지 않고, 과학적 정당성이 있을 때만 사용되어야 한다.
- (3) 만일 시험물질이 음용수와 혼합되는 경우 특히 단일 투여 시 사료 및 물을 먹고 교배하는 사이에 지연이 그 영향을 검출하기에 충분해야 한다는 것을 주의해야 한다 (5.3.13 (2)).
- (4) 위관 또는 주사로 한 번에 투여될 수 있는 액체의 최대 부피는 시험동물의 크기에 따라 달라진다. 그 부피는 체중 100 g당 2 ml의 최대 수용액을 사용할 수 있는 경우를 제외하고는 일반적으로 체중 100 g당 1 ml를 넘지 않아야 한다. 그 이상의 부피를 사용하는 것은 (동물 복지 법률로 허용된 경우) 정당화되어야 한다.
- (5) 시험 부피의 가변성은 모든 용량 수준에서 체중에 비례하여 일정한 부피를 보장하는 농도를 조정함으로써 최소화되어야 한다.

5.3.12 관찰

- (1) 실험동물의 일반적 임상관찰이 이루어져야 하고 임상 증상은 적어도 하루에 한 번 기록하여야 하며, 매일 같은 시간이 바람직하고 투여 후 예상 효과의 최대 기간을 고려하여야 한다.
- (2) 투여 기간 동안 적어도 하루에 두 번은 모든 실험동물들의 이환율과 사망률이 관찰하여야 한다.

- (3) 모든 실험동물들의 체중은 시험 개시 시, 반복-투여 시간 동안은 적어도 1주일에 한 번 및 인도적 희생 시에 측정하여야 한다.
- (4) 사료 섭취량의 측정은 적어도 1주 단위로 실시하여야 한다. 만약 시험물질이 식수를 통해 투여되면 물 섭취량은 매번 물을 갈아줄 때 및 적어도 1주일에 한 번은 측정하여야 한다.
- (5) 과도한 독성의 빈사-치사 징후를 보이는 실험동물들은 시험기간이 종료되기 전에 인도적으로 희생한다.

5.3.13 조직의 수집 및 처리

- (1) 마우스의 경우 임신 13일, 랫드의 경우 임신 14~15일의 임신 후반기에 암컷을 인도적 희생한다.
- (2) 자궁은 착상의 수, 살아있거나 죽은 배아 및 황체의 수를 결정하는 우성치사 영향을 조사한다.
- (3) 자궁각(uterine horn) 및 난소를 절개하여 황체를 계수하고 태아를 적출, 계수한 후 무게를 잰다. 살아있는 태아에 가려진 자궁의 재흡수를 검사하고 모든 재흡수를 계수하는데 주의해야 한다.
- (4) 태아 사망률은 계수되고, 성공적으로 임신된 암컷의 수와 총 착상, 착상전 손실 및 착상후 사망률(조기 및 지연 재흡수를 포함하는) 또한 기록되어야 한다.
- (5) 또한 보이는 태자들은 최소한 2주간 부양액에 고정하여 주요한 외부기형을 검사함으로써, 그 물질이 생식과 발생에 미치는 추가적 정보를 얻을 수 있다.

6. 시험결과 및 보고

6.1 결과의 처리

6.1.1 자료들은 교배된 수컷의 수, 임신한 암컷의 수와 임신하지 않은 암컷의 수를 표시하도록 도표화 한다. 각 수컷과 암컷의 확인을 포함하는 교배의 결과들은 개별적으로 보고되어야 한다.

6.1.2 교배 간격, 투여된 수컷의 용량 수준 및 살아 있는 착상의 수와 죽은 착상의 수는 각 암컷 마다 계수되어야 한다.

6.1.3 착상후 손실은 처리군의 전체 착상에 대해 죽은 것의 비율과 매개물질/용매 대조군의 전체 착상에 대해 죽은 것의 비율을 결정함으로써 계산한다.

6.1.4 착상전 손실은 황체의 수와 착상의 수 간의 차이 또는 대조 교배와 비교하여 암컷당 평균 착상의 수의 차이로 계산한다. 착상전 손실이 예상되는 경우는 반드시 보고되어야 한다.

6.1.5 우성치사인자는 (착상후 사망/암컷당 전체 착상) \times 100으로 추정한다.

6.1.6 독성 자료와 임상 증상(5.3.12 (1))은 보고되어야 한다.

6.2 수용 기준

6.2.1 시험 수용가능성을 결정하는 기준은 다음과 같다.

- (1) 동시에 수행되는 음성대조군은 과거 음성대조 자료를 위한 보고된 자료와, 가능한 경우 실험실의 과거 대조 자료와 일치한다(5.2.1 및 5.3.7).
- (2) 동시에 수행되는 양성대조군들은 과거 양성대조 자료를 위한 보고된 표준과 일치하거나, 가능한 경우 실험실의 과거 양성대조와 데이터베이스와 일치하며, 음성대조(5.3.6 (2) 및 5.3.7 참조)와 비교하여 통계적으로 유의한 증가를 나타낸다.
- (3) 적절한 전체 착상 수와 용량은 분석한다(5.3.8 (3)).
- (4) 최고 용량의 선택을 위한 기준은 5.3.10에 기술한 내용과 일치한다.

6.3 결과의 평가 및 해석

6.3.1 용량-반응 분석에 충분한 자료들을 제공하기 위해 적어도 세 개의 투여군이 분석되어야 한다.

6.3.2 다음의 모든 수용기준을 충족하면, 시험물질은 확실히 양성으로 간주한다.

- (1) 시험 용량 중 적어도 하나가 동시에 수행되는 음성대조군에 비해 통계적으로 유의한 증가를 나타냄.
- (2) 이러한 증가가 적절한 시험으로 평가될 때 적어도 한 개의 실험조건(예, 매주 교배 간격)과 용량-관련임.
- (3) 이 결과들 모두가 음성대조 자료의 수용가능한 범위, 가능한 경우 실험실 과거 음성대조 자료(예 : Poisson-based 95% 대조 한계치)의 분포에서 벗어남.
- (4) 이 경우 그 시험물질은 시험동물의 생식세포에서 우성치사 돌연변이를 유도할 수 있는 것으로 여겨진다.
- (5) 가장 적절한 통계적 방법에 대한 권고는 6.3.3 (8)에 설명되었고, 사용된 통계적 방법은 그 동물을 실험단위로 고려해야 한다.

6.3.3 아래의 모든 수용 기준을 만족하는 경우, 한 시험물질은 완벽한 음성으로 고려한다.

- (1) 모든 시험 용량에서 동시에 수행되는 음성대조와 비교하여 통계적으로 유의한 증가를 보이지 않는 경우
- (2) 모든 실험조건에서 용량-관련 증가가 전혀 없는 경우
- (3) 모든 음성대조자료 결과들이 수용 가능한 범위 내에 있거나, 가능한 경우 실험실의 과거 음성대조 자료(예 : Poisson-based 95% 대조 한계치) 내에 있는 경우

- (4) 이때 시험물질이 실험동물의 생식세포에서 우성치사 돌연변이를 유도할 수 없는 것으로 간주한다.
- (5) 명확한 양성 또는 명확한 음성반응의 검증은 필요하지 않다.
- (6) 만약 반응이 명확한 음성 또는 양성이 아닌 결과의 생물학적 관련성을 평가하고자 하는 경우(예, 약한 경계선의 증가), 그 자료는 음성대조군 자료 또는 실험실의 과거 과거 대조자료와 비교하여 전문가의 판단과/또는 존재하는 실험 자료를 사용한 심층 조사에 의해 평가되어야 한다.
- (7) 드문 경우 그 자료들이 양성 혹은 음성으로 결론내려지지 못할 때라는 것을 배제할 것이고, 따라서 모호함(equivocal)으로 결론 내려질 것이다.
- (8) 사용되는 통계학적 분석들은 수컷 실험동물을 실험단위로 간주해야 한다.
- (9) 계수 자료(예, 암컷 당 착상의 수)는 Poisson 분포 및/또는 비율(예, 죽은 착상의 비율)은 이항 분산될 수 있으며, 주로 이런 자료가 과분산되는 경우이다. 따라서 통계 분석은 Cochran 이항 분산 시험 또는 Tarone C(α) 시험과 같은 분산 시험을 이용하여 과소분산을 위한 시험을 우선 사용해야 한다.
- (10) 이항 분산으로부터 어떤 이탈도 검출되지 않으면, 용량 수준에 걸치는 비율의 추세는 Cochran-Armitage 추이 시험을 이용하여 시험될 수 있고, 대조군과의 쌍대 비교는 Fisher's 정확성 시험을 이용하여 시험될 수 있다. 마찬가지로 Poisson 분포에서 어떤 이탈도 검출되지 않으면 계수의 동향은 Poisson 회귀를 이용하여 시험될 수 있고 대조군과의 쌍대비교는 쌍대 대조를 이용하여 Poisson 모델의 문맥 안에서 시험될 수 있다.
- (11) 만약 중요한 과분산 또는 과소분산이 검출되면 비모수적 방법을 권장한다. 이것은 추이와 대조군과의 쌍대 비교를 위한 순열, 재샘플링 또는 bootstrap 시험 뿐만 아니라 추이를 위한 Jonckheere-Terpstra 시험 및 매개물질/용매 대조군과 쌍대비교를 위한 Mann-Whitney 시험과 같은 rank-based 시험을 포함한다.
- (12) 양성 우성치사 시험은 시험 종의 투여된 수컷의 생식세포에서 시험물질의 유전독

(12) 성에 대한 근거를 제공한다.

(13) 관찰된 값들이 과거 대조 자료 범위에 들어가는지 여부에 대한 고려는 그 반응의 생물학적 중요성을 평가할 때 지침을 제공할 수 있다.

6.4 시험 보고서

6.4.1 시험보고서는 다음의 정보를 포함해야 한다.

(1) 요약

(2) 시험물질

(가) 가능한 경우 입수원, 롯트 번호, 사용제한 일자

(나) 알려진 경우 시험물질의 안정성

(다) 알려진 경우 시험물질의 용매중 용해도 및 안정성

(라) 해당될 경우 시험물질이 첨가된 배양액의 pH, 삼투압 및 침전도 측정

(3) 단일 구성 물질

(가) 물리적 성상, 수용해도 및 이에 상응하는 추가 물리화학적 성질

(나) 해당되거나 현실적으로 가능할 경우 IUPAC 또는 CAS명 등의 화학물질명, SMILES 또는 InChI 코드, 구조적 성상, 순도, 적절하고 실용적으로 가능한 불순물의 화학적 성질 등

(4) 다구성 물질, UVCB 및 혼합물

(가) 구성성분에 대해 가능하면 화학적인 동정에 의한 특성규명, 정량적인 구성 및 관련 물리화학적 특성

(5) 시험물질 조제

(가) 매개물질의 선택을 위한 정당성

(나) 알려진 경우 용매/매개물질에서 시험물질의 용해도 및 안정성

(다) 식이, 식수 또는 흡입 제제의 준비

(라) 수행한 경우 제제에 대한 분석 결정 (예, 안정성, 균질성, 농도)

(6) 시험동물

(가) 사용된 종/품종 및 사용에 대한 정당성

(나) 동물의 수 및 주령

(다) 입수원, 사육 조건, 식이 등

(라) 각 동물을 식별하기 위한 고유의 방법

(마) 단기 연구 : 시험의 시작과 끝에서 각 동물의 개별 체중; 1주 이상의 연구 : 시험 기간 중 개별 중량 및 사료 섭취량, 체중 범위, 각 군의 평균 및 표준편차를 포함해야 한다.

(7) 시험조건

(가) 양성 및 음성(매개물질/용매) 대조군 자료

(나) 수행한 경우 범위-결정 시험의 자료

(다) 용량 수준 선택에 대한 근거

(라) 시험물질 조제의 세부사항

(마) 시험물질 관리의 세부사항

(바) 투여 경로에 대한 근거

(사) 가능한 경우 조직병리학적 또는 혈액학적 분석 및 동물 관찰과 체중 측정의 빈도를 포함하는 동물 독성 측정 방법

(아) 음성 결과를 얻은 경우 시험물질이 표적 조직 또는 일반적 순환에 도달한 것을 확인하는 방법

(자) 적용가능한 경우 식이/식수 중 시험물질 농도(ppm) 및 섭취량으로부터 계산되는 실제 투여량(매일 체중 kg당 mg/)

(차) 식품 및 수질의 세부사항

(카) 케이지 환경 풍요화에 대한 세부사항

(타) 선택에 대한 처리 및 샘플링 일정과 정당성에 대한 자세한 설명

(파) 마취의 방법

(하) 안락사의 방법

(거) 조직을 분리하고 보존하기 위한 절차

(너) (해당되는 경우) 모든 장비 및 시약의 입수원과 로트 번호

(더) 우성치사의 계산 방법

(러) 짝짓기 일정

(머) 짝짓기하는데 사용된 방법

(버) 안락사의 시간

(서) 황체, 착상, 재흡수 및 착상전 손실, 생착상(live implants), 사착상(dead implants)을 포함하는 우성치사 효과의 기준

(8) 결과

(가) 독성의 징후를 포함하는 시험기간 이전 및 기간 중의 동물의 상태

(나) 처리와 짝짓기 기간 중의 수컷 체중

(다) 짝짓기 암컷의 수

(라) 가능한 경우 용량-반응 관계

(마) 범위, 평균 및 표준편차를 포함하는 동시에 수행되는 음성대조자료 및 과거 음성대조자료(Historical negative control data)

(바) 동시에 수행되는 양성대조군 자료

(사) 황체의 수, 착상의 수, 재흡수 및 착상전 손실의 수, 생착상 수, 사착상 수, 태아 체중을 포함하는 표로 된 자료

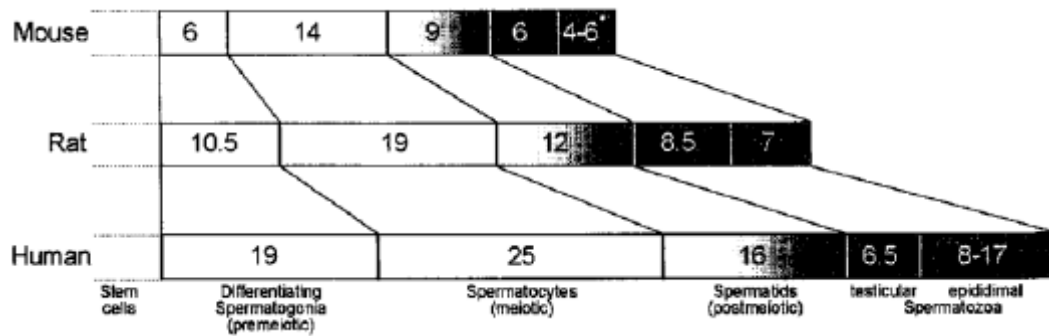
(아) 우성치사 빈도를 포함하는 각 짝짓기 기간과 용량에 대해 요약한 위의 자료

(자) 적용된 통계분석 및 방법

(9) 결과의 고찰

(10) 결론

<부록> 포유류에서 정자형성의 시기



[그림 1] 마우스, 랫드 및 사람에서 수컷 생식세포 발생의 기간(일)에 대한 비교. DNA 복구는 음영으로 나타낸 기간 동안에는 일어나지 않음.

지침 개정 이력

□ 개정일 : 2021. 10.

- 개정자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 임경택
- 개정사유 : 산업안전보건법령 및 관련 고시 폐지 등 개정
- 주요 개정내용
 - 산업안전보건법 전면개정에 따른 변경내용 반영
 - 고용노동부 고시(화학물질의 유해성.위험성 시험 등에 관한 기준, 고용노동부 고시 제2020-57호) 폐지에 따른 국립환경과학원 고시(화학물질의 시험방법에 관한 규정) 인용