

KOSHA GUIDE

T - 23 - 2021

화학물질의 유전독성 평가를 위한  
포유류 정원세포 염색체이상시험 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
  - “Mammalian Spermatogonial Chromosomal Aberration Test”, OECD Guidelines for the testing of chemicals, Section 4 / Test No. 483, 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 위한포유류 정원세포 염색체이상시험 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 유전독성 평가를 위해 수행하는 포유류 정원세포를 이용한 염색체이상시험 방법의 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 포유류 정원세포를 이용한 염색체이상시험 방법 및 결과의 작성에 적용한다.

### 3. 용어의 정의

(1) 이 지침에서 사용되는 용어의 정의는 다음과 같다.

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

(나) “이수성(Aneuploidy)”이란 하나 이상의 염색체에서 상동염색체의 개수가 정상과 다른 성질을 말한다.

(다) “배수성(Polyploidy)”이란 두 벌 이상의 염색체를 가지는 생명체의 성질을 말한다.

- (라) “갭(Gap)”이란 염색분체(Chromatid)의 폭 보다 작고, 염색분체가 정렬되어 있지 않은 비염색체성 병소(Achromatic lesion)를 말한다.
- (마) “중기 세포(Metaphase cell)”란 세포의 분열단계 중 중기(中期)에 해당하는 과정에 있는 세포를 말한다.
- (바) “딸세포(Daughter cell)”란 한 개의 세포에서 분열한 새로운 세포를 말한다.
- (사) “딸염색체(Daughter chromosome)”란 한 세포가 가지고 있던 염색체가 분열된 딸세포를 위해 그 일부를 전해준 염색체를 말한다.
- (아) “이수체 유발물질(Aneugen)”이란 유사분열이나 감수분열 시에 염색체수의 변화(Aneuploidy)를 유발하는 물질을 말한다.
- (자) “염색체이상 유발물질(Clastogen)”이란 염색체 파손의 원인이 되는 물질을 말한다.
- (차) “EMS”란 Ethyl methanesulfonate(에틸 메탄술포산)으로서, 환경성 돌연변이원으로 사용되는 대표적인 화학물질을 말한다.
- (카) “동원체(Centromere, Kinetochore)”란 세포분열 시 염색체에 방추사가 붙어 나누어짐으로써 두 개의 딸세포로 이동할 수 있게 하는 염색체의 특정 부위를 말한다.
- (타) “염색체 다양성(Chromosome diversity)”이란 염색체의 형태와 크기의 다양성을 말한다.
- (파) “염색분체이상(Chromatid-type aberration)”이란 단일 염색분체가 절단 및 재결합됨으로써 나타나는 구조적 이상을 말한다.
- (하) “염색체이상(Chromosome-type aberration)”이란 두 염색분체가 동일한 위치에서 절단 또는 재결합됨으로써 나타나는 구조의 이상을 말한다.

- (거) “유전독성(Genotoxic)”이란 절단(breaks), 결실(deletions), 부가(adducts), 뉴클레오티드 변화(nucleotides modifications) 및 연결(linkages), 재배열(rearrangements), 돌연변이(mutations), 염색체이상(chromosome aberrations) 및 이수성(aneploidy)을 포함하는 모든 유형의 DNA 또는 염색체 손상을 말한다.
- (너) “유사분열지수(Mitotic index)”란 증식정도를 나타내는 지수로서 전체 관찰세포 중 세포분열 중기의 세포 비율을 말한다.
- (더) “유사분열(Mitosis)”이란 대체로 전기(prophase), 전중기(prometaphase), 중기(metaphase), 후기(anaphase)와 말기(telophase)로 나뉘는 세포 핵의 분열을 말한다.
- (러) “변이원성(Mutagenic)”이란 유전자의 DNA 염기서열 또는 염색체의 구조에 생기는 유전적 변화를 일으키는 성질을 말한다.
- (머) “수적 이상(Numerical aberration)”이란 세포의 일반 염색체 수와 다르게 염색체 수가 변화된 것을 말한다.
- (버) “염색체 구조의 이상(Structural aberration)”이란 세포분열 중기에서 현미경관찰로 검출가능한 결실(Deletion), 파편화(Fragments), 염색체내 교환(Intrachanges), 염색체간 교환(Interchanges) 등 염색체 및 염색분체의 구조 변화를 말한다.
- (서) “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.
- (2) 그 밖의 용어의 뜻은 이 지침에서 특별히 규정하는 경우를 제외하고는 산업안전보건법, 같은 법 시행령, 같은 법 시행규칙 및 국립환경과학원 고시에서 정하는 바에 의한다.

## 4. 시험 개요

### 4.1 개요

4.1.1 OECD 가이드라인 483은 1997년에 제정되었다. 동 시험 지침은 일련의 유전독성에 대한 시험지침 중의 하나이며, 다년간의 경험과 통합 또는 기타 독성 또는 유전독

4.1.1 성 시험들을 결합한 내용을 반영하고 있다. 혼합 독성시험은 독성시험에서 사용되는 동물의 수를 줄일 수 있다.

4.1.2 생체내 포유류 정원세포 염색체이상시험의 목적은 포유류의 정원세포에서 구조적 염색체 이상을 일으키는 화학물질들을 확인하는 것이다. 또한 이 시험은 종에 따라 다를 수 있지만, 생체내 대사 인자, 약물 동역학 및 DNA 복구과정이 활성화되어 반응에 기여한다.

4.1.3 이 지침은 수적 이상을 측정하도록 설계되지 않았고, 이 시험은 그 목적을 위해 정기적으로 사용되지 않는다.

4.1.4 이 시험은 분열 중인 정원세포에서 구조적 염색체 이상(염색체형 및 염색분체형 모두)을 측정하고, 따라서 이들 생식세포에서 유전성 돌연변이의 유발을 예측할 수 있을 것이다.

### 4.2 초기 고려사항

4.2.1 설치류는 이 시험에서 일상적으로 사용되지만 다른 종들도 과학적으로 정당화되면 적절하게 사용할 수 있다. 설치류 고환의 표준 세포유전학적 표본제작으로 유사분열(정원세포) 및 감수분열(정모세포) 중기를 볼 수 있다.

4.2.2 유사분열 및 감수분열 중기는 염색체의 형태를 기반으로 식별한다. 이 생체내 세포 유전학적 시험은 정원세포 유사분열에서 구조적 염색체이상을 감지하며, 다른 표적 세포들은 이 지침에서는 다루지 않는다.

4.2.3 정원세포에서 염색분체형 이상을 감지하기 위해, 노출 후 첫 번째 유사분열은 이 이상이 후속되는 세포 분열에서 염색체형으로 변환되기 이전에 조사되어야 한다.

4.2.4 노출된 정모세포로부터의 추가 정보는 제1 이동기(감수 제1 분열 전기의 최종 단계)-중기 및 제2 중기에서 염색체 구조적 이상을 위한 감수분열 염색체 분석으로 얻어질 수 있다.

4.2.5 여러 세대의 정원세포가 고환에 존재하고, 서로 다른 생식세포 유형은 화학물질 노출에 여러 형태의 민감도를 가질 수 있다. 따라서 검출된 이상들은 노출된 정원세포 집단의 집단 반응을 나타낸다. 고환 준비에서 대부분의 유사분열 세포들은 B 정원세포로서, 대략 26시간의 세포주기를 갖는다.

4.2.6 시험물질 또는 그 대사체가 고환에 도달하지 않을 것이라는 증거가 있으면 이 시험에 사용은 적절하지 않다.

#### 4.3 시험법의 원리

4.3.1 일반적으로 동물은 적절한 노출 경로로 시험물질에 노출되고 투여 후 적절한 시간에 인도적으로 희생한다.

4.3.2 인도적 희생 전에 동물들은 중기-정지 약물(예, 콜히친 또는 콜세미드®)로 처리한다. 이후 생식세포로부터 염색체가 준비되고 염색되며, 중기 세포들은 염색체이상을 분석한다.

#### 4.4 실험실 능력의 검증

4.4.1 이 시험의 능력은 표 1에 나타낸 것과 같은 양성대조물질(약한 반응 포함) 및 가능한 경우 실험실의 과거 대조군 분포 또는 대조군 자료의 수용가능 범위와 일치하는 음성대조 빈도를 확보하고 정원세포에서의 구조적 염색체이상의 빈도에 대한 예상 결과를 재현할 수 있는 능력으로 입증되어야 한다.

## 5. 시험 방법

### 5.1 준비

#### 5.1.1 동물 종의 선택

(가) 일반적으로 사용되는 실험동물은 건강하고 젊은 성체 동물이어야 한다. 수컷 마우스가 일반적으로 이용되지만, 다른 적절한 포유류 종의 수컷은 과학적으로 정당화되고 이 시험이 다른 시험시침과 함께 실행될 수 있도록 하기 위한 때에 사용될 수 있다.

(나) 설치류 이외의 종을 사용하는 경우 그 과학적 정당성은 보고서에 서술되어야 한다.

#### 5.1.2 동물 사육 및 식이조건

(가) 설치류에서는 실험동물실의 온도는 이상적으로  $22^{\circ}\text{C}(\pm 3^{\circ}\text{C})$ 이어야 한다. 상대습도는 50~60%를, 동물실 청소 시 이외에는 적어도 40% 이상 70%를 넘지 않도록 하는 것이 바람직하다.

(나) 조명은 인공적으로 연속 12시간은 밝고, 12시간은 어둡게 해야 한다. 먹이는 무제한 식수의 공급과 더불어 종래의 실험식이를 사용할 수 있다.

(다) 먹이의 선택은 이 경로로 투여될 때 시험물질의 적절한 혼합을 보장할 필요에 의해 영향을 받을 수 있다.

(라) 공격적인 행동이 예상되지 않으면 같은 성별의 작은 군(케이지 당 다섯 마리 이하)으로 사육해야 하고, 적절히 풍요한 환경을 갖춘 단단한 바닥의 케이지가 바람직하다.

(마) 동물은 과학적으로 정당화된 경우에만 개별적으로 수용할 수 있다.



### 5.1.3 동물의 준비

- (가) 건강하고 젊은 성체 수컷 동물(투여 시작시 8~12주)이 일반적으로 사용되며, 대조 및 시험군을 무작위적으로 할당한다.
- (나) 개별 동물들은 특이적, 인도적이며 최소 침습적인 방법(예, 고리, 꼬리표, 마이크로칩 및 생체인식을 포함하지만 발가락과 귀의 클리핑은 안됨)으로 식별되며 적어도 5일 동안 실험실 조건에 적응시킨다.
- (다) 케이지는 배치로 인한 효과를 최소화하는 방법으로 배치하여야 하며, 양성대조군 및 시험물질에 의한 교차오염을 피해야 한다.
- (라) 시험의 시작 시에 동물의 체중 변화는 최소화해야 하고, 평균체중의  $\pm 20\%$ 를 초과하지 않아야 한다.

### 5.1.4 시험물질의 조제

- (가) 고체상 시험물질들은 동물들에 투여하기 전에 녹이거나 적절한 매개물질에 현탁하거나 먹이 또는 음용수에 혼합하여야 한다.
- (나) 액체상 물질들은 직접 투여 또는 투여에 앞서 희석할 수 있다.
- (다) 흡입노출의 경우 시험물질은 그 물리화학적 특성에 따라 가스, 증기 또는 고체/액체 에어로졸로 투여할 수 있다.
- (라) 시험물질의 안정성 자료 확보와 적절한 저장조건을 확보하는 신선한 조제가 이루어져야 한다.

### 5.2 시험 조건들 - 용매/매개물질

- (가) 용매/매개물질은 사용되는 용량 수준에서 독성 영향을 일으키지 않아야 하며, 시험물질과의 화학반응이 의심되지 않아야 한다.

- (나) 잘 알려진 용매/매개물질이 사용되지 않는 경우 그 포함은 그 호환성을 나타내는 참고자료들이 지원되어야 한다.
- (다) 가능한 수용성 용매/매개물질의 사용을 가장 우선적으로 고려할 것을 권고한다. 일반적으로 사용되는 호환성 용매/매개물질은 물, 생리식염수, 메틸셀룰로스 용액, 카복시메틸셀룰로스 나트륨염 용액, 올리브오일 및 옥수수기름을 포함한다.
- (라) 선택된 비정형 용매/매개물질로 유도된 구조적 염색체이상과 다른 유해 효과를 보이지 않는 과거 또는 발표된 대조 자료가 없는 경우 초기연구는 용매/매개물질 대조의 수용성을 설정하기 위해 수행되어야 한다.

### 5.3 양성대조군

- (가) 동시에 수행되는 양성대조군 동물은 시험의 수행에서 실험실 능력을 입증하고, 최근 과거(예, 최근 5년 이내)에 정기적으로 시험을 사용하고 있지 않는 한 항상 사용되어야 한다.
- (나) 동시에 수행되는 양성대조군이 포함되지 않은 경우, 대조군 계수(고정 및 염색 슬라이드)는 각 시험마다 포함되어야 한다. 이것은 시험을 수행하는 실험실에서 주기적으로(예, 매 6~18주) 수행한 각각의 양성대조 실험으로부터 획득 및 저장된 적절한 표준시료의 계수 내에서 포함시켜 얻을 수 있다(예를 들어, 능력시험 중 및 그 후 필요한 정기 시험 중).
- (다) 양성대조물질의 예를 <표 1>에 나타냈다.

<표 1> 양성대조물질의 예

물질명 (CAS 번호)
Cyclophosphamide (monohydrate) (50-18-0 (6055-19-2))
Cyclohexylamine (108-91-8)
Mitomycin C (50-07-7)
Monomeric acrylamide (번호 79-06-1)
Triethylenemelamine (51-18-3)

#### 5.4 음성대조군

- (가) 용매 또는 매개물질을 처리하는 것 외에는 투여군과 동일한 처치를 받는 음성대조 동물을 모든 시료채취 시간에 포함한다.
- (나) 선택된 용매/매개물질이 염색체이상이나 해로운 영향을 유발하지 않는다는 배경자료나 발표된 대조자료가 없는 경우에는 매개물질의 타당성을 확립하기 위하여 무처치동물을 모든 시료채취시간에 포함시켜야 한다.

#### 5.5 절차

##### 5.5.1 동물의 수

- (가) 시험 시작 시 군의 크기는 군당 최소 5마리의 수컷 동물이 제공될 목적으로 확립되어야 한다.
- (나) 군당 동물 수는 적절한 통계능력(즉, 0.05의 유의수준에서 80%의 확률로 음성대조 수준이 1.0% 이상일 때 염색체이상 빈도가 일반적으로 적어도 두 배 이상 검출될 수 있는)을 제공하기에 충분한 것으로 여겨진다.
- (다) 최대 전형적 동물 요구사항에서와 같이, 세 개의 용량군에서 두 시료채취 시간과 동시에 수행되는 음성대조군을 갖는 시험은 한 개의 양성대조군(각각 군당 다섯마리의 동물로 구성)을 포함, 45마리의 동물을 필요로 한다.

##### 5.5.2 투여 일정

- (가) 시험물질은 주로 한 번 투여(즉, 단회 투여)되며, 다른 투여법이 사용될 수 있고, 그것은 과학적 정당성이 입증되어야 한다.
- (나) 최고 용량군에서 노출 후 두 번의 시료채취 시간을 사용한다. 시험 물질의 세포주기 동력학에 미치는 영향뿐만 아니라 흡수 및 대사에 필요한 시간으로 인해 염색체이상 검출에 적절한 시간에 영향을 미칠 수 있으며, 한 번의 초기, 한 번의 후기 시료채취 시간은 투여 후 약 24시간과 48시간을 이용한다.

- (다) 최고 용량 이외 용량의 경우, 투여 후 24시간의 초기 시료채취 시간(B 정원세포의 세포주기 이하이며 따라서 투여 후 첫 중기의 계수 확률에 최적화 됨)을 사용해야 하고, 그렇지 않으면 더욱 적절하고 정당하다고 알려진 또 다른 시료채취 시간을 사용해야 한다.
- (라) 다른 시료채취 시간이 사용될 수 있으며, S기 비의존적 효과를 나타내는 화학물 질인 경우 더 이른 시료채취 시간(즉, 24시간 이하)이 적절할 수 있다.
- (마) 28일 투여기간(예, OECD TG 488)을 사용하는 또 다른 종말점의 시험과 함께 반복투여 방법이 사용될 수 있지만, 추가 동물군은 다른 시료채취 시간을 수용하는
- (마) 데 필요하다. 따라서 이런 일정의 적절성은 사례별로 과학적 정당성을 요구한다.
- (바) 인도적 희생에 앞서 동물은 적절한 용량의 중기-정지 약물(예, 콜히친 또는 콜세미드®)을 복강으로 투여한다. 이후 동물은 적절한 간격으로 시료를 채취한다.
- (사) 마우스와 랫드의 경우 이 간격은 약 3~5시간이다.

### 5.5.3 용량 수준

- (가) 투여량의 선택을 돕기 위해 다른 중요한 연구로부터 얻을 수 있는 적절한 자료의 부족으로 예비 용량결정 시험을 수행했다면, 용량결정 시험들의 수행을 위한 현재의 접근에 따라 본시험에서 사용된 같은 종, 계통, 성별 및 투여 방법을 사용한 같은 실험실에서 수행하여야 한다.
- (나) 이 시험에서 목표로 하는 최대 허용 용량(MTD)은 사망, 통증의 증거, 인도적 희생을 필요로 하는 고통이 아니라, 시험기간에 비교적 약간의 독성을 유발하는 용량으로(예를 들어, 비정상적 행동이나 반응, 약간의 체중 감소 또는 조혈기계 세포독성) 정의한다.
- (다) 또한 최고 용량은 정원세포에서 어떤 독성을 유발하는 용량(예, 제1 및 제2 감수분열 중기에 대한 정원세포 유사분열 비율의 감소)으로 정의될 수 있다. 이 감소는 50%를 넘지 않아야 한다.

- (라) 낮은 비독성 용량(호르몬 및 유사분열 촉진물질과 같은)에서 특정한 생물학적 활성을 가지는 시험물질 및 독성동태학적 특성의 포화를 나타내는 화학물질은 용량 설정 기준에 예외일 수 있고 경우에 따라 평가되어야 한다.
- (마) 용량 반응 정보를 얻기 위한 완전한 시험은 음성대조군(5.4)과, 일반적으로 공비가 2에서 4로, 적어도 세 가지 용량 수준을 포함해야 한다.
- (바) 만일 시험물질이 용량결정 시험 또는 기존 자료에 근거하여 독성을 나타내지 않으면, 단회 투여의 최고 용량은 체중 kg당 2,000 mg을 초과하지 않아야 한다.
- (사) 하지만 만약 시험물질이 독성을 일으키지 않으면, MTD가 가장 높은 투여용량이어야 하고, 사용된 용량수준은 독성이 없거나 거의 나타나지 않는 용량을 포함하는 범위로 하는 것이 바람직하다.
- (아) 표적조직(즉, 고환)의 독성이 모든 용량 수준에서 관찰되면, 비독성 투여량으로의 추가 연구가 바람직하다. 정량적인 용량-반응 정보를 더 확실히 알아내기 위해서는 투여군의 추가가 필요할 수 있다.
- (자) 어떤 유형의 물질들(예를 들면 사람의 의약품)에는 특정한 요구사항이 적용되고, 한계용량은 달라질 수 있다. 만일 시험물질이 독성을 나타낸다면 한계용량에 추가하여 (위에 설명한 대로) 두 단계의 낮은 용량을 설정해야 한다.
- (차) 14일 이상의 투여기간 동안 한계용량은 일일 체중 kg당 1,000 mg이고, 14일 미만의 투여기간에는 매일 체중 kg당 2,000 mg이다.

#### 5.5.4 투여 방법

- (가) 시험을 설계할 때는 사람의 노출에서 예상되는 경로가 고려되어야 한다. 따라서 식이, 식수, 국소, 피하, 정맥, 경구(위관), 흡입 또는 주입과 같은 노출경로가 정당화를 통해 선택될 수 있다.
- (나) 어떤 경우에도 그 경로는 표적 조직의 적절한 노출을 보장하기 위해 선택되어야 한다. 복강 투여는 과학적으로 정당화된 사람 노출의 생리학적인 관련 경로가 아니므로 일반적으로 권장되지 않는다.

- (다) 만일 시험물질이 식이 또는 음료수와 혼합되면, 특히 단일 투여 시 식이와 음료수 섭취 및 시료채취 간의 지연이 효과의 검출을 허용하기에 충분하도록 주의 기울여야 한다(5.5.7 (나)).
- (라) 위관 또는 주사로 한 번에 투여될 수 있는 액체의 최대 부피는 시험 동물의 크기에 따라 달라진다. 그 부피는 최대 체중 100 g 당 2 ml의 최대 용량인 수용액인 경우를 제외하고는 일반적으로 체중 100 g 당 1 ml를 넘지 않아야 한다. 이를 초과하는 부피의 사용은 (동물복지 법률에 의해 허용된 경우) 정당화되어야 한다.
- (마) 투여물질 부피의 가변성은 모든 용량 수준에서 체중에 비해 일정한 용량을 보장하는 농도로 조정함으로써 최소화되어야 한다.

#### 5.5.5 관찰

- (가) 동물들의 건강에 관련된 일반 임상관찰은 적어도 하루 한 번 이상 측정 및 기록되어야 하고, 매일 같은 시간이 바람직하며, 투여 이후 기대되는 영향의 최고 기간을 고려해야 한다.
- (나) 적어도 하루에 두 번 모든 동물들은 이환율과 사망률을 관찰되어야 한다.
- (다) 1주 이상 긴 기간의 연구인 경우 모든 동물들은 적어도 1주에 한 번 및 안락사를 시킬 때 체중을 측정해야 하고, 사료소비량은 식이가 바뀌었을 때를 포함하여 최소 주 1회 측정되어야 한다.
- (라) 시험물질이 음용수를 통해 투여되는 경우 음용수 소비량은 음용수를 갈아줄 때를 포함하여 최소 주 1회 측정되어야 한다.
- (마) 과도한 비치사적 독성 지표들을 나타내는 동물은 실험기간 완료 이전에 인도적으로 희생되어야 한다.

#### 5.5.6 염색체 준비

- (가) 인도적 희생 후 즉시 한 쪽 또는 양 쪽 정소로부터 생식세포 현탁액을 만들어 저장성 용액에 노출하고 확립된 절차에 따라 고정한다.

- (나) 이후 세포는 슬라이드에 없어 염색한다. 모든 슬라이드는 그 실체를 계수자가 알 수 없도록 암호화해야 한다.

### 5.5.7 분석

- (가) 각 동물 당 적어도 200개의 중기세포가 계수되어야 한다. 과거 대조 자료의 빈도가 1% 미만인 경우 통계력을 증가시키기 위해 동물 당 200개 이상의 세포가 계수되어야 한다.
- (나) 동원체의 실체를 보일 수 있는 염색법이 사용되어야 한다.
- (다) 염색체형 및 염색분체형 이상은 각각 하위 유형(절단, 교환)으로 분류되고 기록되어야 한다.
- (라) 갭(Gap)은 기록되어야 하지만 염색체이상을 갖는 세포들의 빈도를 유의하게 증가시키는 화합물인지를 결정하는 때는 고려되지 않는다.
- (마) 실험실에서 사용하는 절차는 잘 훈련된 계수자에 의해 염색체이상의 분석이 수행되고 있음을 확실히 해야 한다.
- (바) 슬라이드 제작 과정에서 종종 일부 중기세포가 부서져 염색체의 손실이 일어남을 인식해야 하며, 따라서  $2n \pm 2$  이상의 염색체를 가진 세포를 계수해야 한다. 여기서  $n$ 은 그 종의 반수염색체 수이다.
- (사) 시험의 목적은 염색체이상을 검출하는 것이지만, 보이는 경우 배수체 세포의 빈도 및 내재복제 염색체를 갖는 세포의 빈도를 기록하는 것이 중요하다(6.3.8 참조).

## 6. 자료 및 보고

### 6.1 결과의 처리

- 6.1.1 개별 동물의 자료는 표의 형태로 제시되어야 한다.

6.1.2 각 동물에 대한 구조적 염색체 이상 세포의 수 및 세포 당 염색체 이상의 수를 평가해야 한다.

6.1.3 하위 유형(절단, 교환)으로 분류된 염색분체 및 염색체형 이상은 각각 그 수 및 시험군과 대조군에 대한 빈도로 나열해야 한다.

6.1.4 갭(Gap)은 별도로 기록한다.

6.1.5 갭(Gap)의 빈도는 기록되지만 일반적으로 전체 구조적 염색체이상 빈도의 분석에는 포함되지 않는다.

6.1.6 배수성의 비율과 내재복제 염색체를 갖는 세포는 보이는 경우 기록한다.

6.1.7 독성의 자료와 임상 증상(5.5.5)은 보고되어야 한다.

## 6.2 수용 기준

6.2.1 시험의 수용은 다음의 기준으로 결정한다.

(가) 동시에 수행되는 음성대조군에서 염색체이상을 가진 세포가 발표된 과거 대조 자료(일반적으로 0보다 크고 1.5% 이하일 것이 예상됨) 및 (보유하고 있다면)그 실험실의 과거 대조 자료와 일관성이 있어야 한다(4.4 및 5.4).

(나) 동시에 수행되는 양성대조군은 과거 양성대조 자료에 대한 표준과 일치하는 반응을 유도하거나, 가능한 경우 실험실의 과거 양성대조 데이터베이스로 되고, 음성대조와 비교하여 통계적으로 유의한 증가를 유발한다(5.3 및 5.4).

(다) 적절한 수의 세포와 용량을 분석한다(5.5.3 및 5.5.7).

(라) 최대 용량의 선택에 대한 기준은 5.5.3에 기술한 것과 일치한다.

(마) 유사분열과 감수분열이 모두 관찰되는 경우, 제1 및 제2 감수분열 중기에 대한 정원세포 유사분열의 비율을 전체 동물 마리 당 100개의 분열 세포 샘플에서 모든 투여군 및 음성대조 동물에서 측정하여 세포독성의 지표로 해야 한다.



(바) 만약 유사분열만 관찰되면, 그 유사분열지수는 각 동물 당 적어도 1,000개의 세포에서 결정되어야 한다.

### 6.3 결과의 평가 및 해석

6.3.1 적어도 세 개의 투여 용량군은 용량-반응 분석을 위해 충분한 자료들이 제공되기 위해 분석되어야 한다.

6.3.2 모든 수용조건을 충족하였다는 전제 하에 시험물질이 아래의 모두에 해당되는 경우 확실히 양성인 것으로 간주한다.

(가) 적어도 한 개의 시험 용량이 동시에 수행되는 음성대조에 비해 통계적으로 유의한 증가를 나타낼 때

(나) 그 증가가 적어도 하나의 시료채취 시간에서 용량-관련 증가될 때

(다) 그 결과 중 하나라도 음성대조 자료의 허용 가능한 범위 밖에 있거나, 가능한 경우 실험실의 과거 음성대조 자료(예, Poisson-based 95% 대조한계)의 분포를 벗어난 경우

6.3.3 이 때 그 시험물질은 시험동물의 정원세포에서 염색체이상을 유도할 수 있는 것으로 간주한다. 사용된 통계에서는 동물을 실험단위로 삼아야 한다.

6.3.4 시험물질이 아래의 모두에 해당되는 경우 확실히 음성인 것으로 간주한다.

(가) 모든 시험 용량이 동시에 수행되는 음성대조와 비교하여 통계적으로 유의한 증가를 나타내지 않으며,

(나) 모든 실험조건에서 아무런 용량-관련 증가가 없고,

(다) 모든 결과가 음성대조 자료의 허용 가능한 범위 안에 있거나, 가능한 경우 실험실의 과거 음성대조 자료(예, Poisson-based 95% 대조한계)의 분포범위 내인 경우

6.3.5 이 때 그 시험물질은 실험동물의 정원세포에서 염색체이상을 유도할 수 없는 것으로 간주한다. 음성 결과는 그 화합물이 연구되지 않은 후기 발달 단계에서 염색체 이상을 유도할 수 있는 가능성 또는 유전자 돌연변이를 배제하지 않는다.

6.3.6 확실한 양성 또는 음성 반응의 증명을 필요로 하지는 않는다.

6.3.7 그 반응이 확실히 음성이거나 양성이지 않고, 결과의 생물학적 관련성을 확립하는데 도움 목적이려면(예, 약하거나 경계선 증가), 그 자료는 기존의 실험자료를 사용하여 전문가의 판단 및/또는 추가 조사를 통해 평가되어야 하는데, 예를 들면 양성 결과가 음성대조 자료의 허용 범위 밖에 있는지 또는 실험실의 과거 음성대조 자료 범위의 밖에 있는지를 고려해야 한다.

6.3.8 추가적인 조사 후에라도, 드문 경우, 그 자료 셋트는 양성 또는 음성 결과의 결론을 배제할 것이고, 따라서 의양성으로 결정될 것이다.

6.3.9 배수체 세포 수의 증가는 그 시험물질이 유사분열 과정을 억제하고 수적 염색체 이상을 유도하는 잠재성을 가지고 있음을 나타낼 수 있다.

6.3.10 내재복제된 염색체를 갖는 세포 수의 증가는 그 시험물질이 세포 주기 진행을 억제하는 잠재성을 가지는 것으로 나타낼 수 있고, 이는 유사분열 과정의 억제와 다른 수적 염색체 변화를 유도하는 다른 기전이다(4.1.2 참조). 따라서 배수체 세포 및 내재복제된 염색체를 갖는 세포의 발생률은 별도로 기록되어야 한다.

## 6.4 시험 보고

6.4.1 시험의 결과보고는 다음을 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, 불순물의 화학적 성질 등

(4) 복합구성 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, 공칭 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 용량결정 시험의 자료

(다) 용량 수준 선택에 대한 근거

(라) 투여 경로에 대한 근거

(마) 양성 및 음성(매개물질/용매) 대조 자료

(바) 시험물질 준비의 세부사항

(사) 시험물질의 관리의 세부사항

(아) 인도적 희생 시점 선정에 대한 근거

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

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

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

(타) 식품 및 수질의 세부사항

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

(하) 안락사의 방법

(거) 사용한 경우 진통의 방법

(너) 조직을 분리하기 위한 절차

(더) 분열중기 정지 동물의 특성과 농도 및 시료채취 전 투여량과 시간

(리) 표본 추출 및 슬라이드 제작 방법

(머) 이상 계수 기준

(버) 동물별 분석 세포의 수

(서) 시험이 양성, 음성 또는 의양성으로 고려되는 기준

## (8) 결과

(가) 독성의 징후를 포함한 시험기간 이전 또는 기간 동안의 동물 상태

(나) 인도적 희생 (여러 가지 처치가 사용된 경우, 그 처리기간 동안 체중 측정) 시 체중 및 장기 무게

(다) 독성의 징후

(라) 유사분열지수

(마) 제1 및 제2 감수분열 중기의 정원성 유사분열 세포의 비율, 또는 표적 조직에 노출된 다른 증거

(바) 각 동물에 개별적으로 제시된 이상의 형태와 수

- (사) 평균과 표준편차를 포함한 각 군당 염색체 이상의 총 수
- (아) 평균과 표준편차를 포함한 각 군당 염색체 이상을 가진 세포의 수
- (자) 가능한 경우 용량-반응 관계
- (차) 적용된 통계분석 및 방법
- (카) 동시에 수행되는 음성대조 자료
- (타) 범위, 평균, 표준편차 및 95% 신뢰구간 (가능한 경우)을 포함하는 과거 음성대조군 자료(Historical negative control data), 또는 시험 결과의 수용에 사용된 논문상 과거 음성대조군 자료
- (파) 동시에 수행되는 양성대조 자료
- (하) 나타나는 경우 배수성 및/또는 내재복제 세포의 빈도를 포함하는 배수성의 변화
- (9) 결과의 고찰
- (10) 결론

## 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