

KOSHA GUIDE

T - 17 - 2021

화화학물질의 유전독성 평가를 위한
포유류 골수세포 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
 - 2015년 11월 산업위생분야 제정위원회 심의(제정)
 - 2019년 11월 산업독성분야 기준제정위원회 심의(개정)
 - 2021년 09월 산업독성분야 기준제정위원회 심의(개정)

- 관련규격 및 자료
 - “Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test”, OECD Guideline for the testing of chemicals. TG475, 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 포유류 골수세포 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 유해성 평가를 위해 실험동물의 골수세포를 이용하여(in vivo) 실시하는 염색체이상시험방법의 제안을 목적으로 한다.

2. 적용범위

이 지침은 산업안전보건법 제105조(유해인자의 유해성·위험성평가 및 관리), 제108조(신규화학물질의 유해성·위험성 조사), 고용노동부 예규(화학물질의 유해성·위험성 평가에 관한 규정) 및 국립환경과학원 고시(화학물질의 시험방법에 관한 규정)에 의거 실험동물의 골수세포를 이용한 염색체이상시험방법 및 결과의 작성에 적용한다.

3. 용어의 정의

(1) 이 지침에서 사용하는 용어의 뜻은 다음과 같다.

(가) “염색체 구조의 이상(Structural aberration)”이란 세포분열 중기에서 현미경관찰로 검출가능한 삭제(Deletion), 조각(Fragments), 세포내교차(Intrachanges), 세포간 교체(Interchanges) 등 염색체 및 염색분체의 구조 변화를 말한다.

(나) “개수의 이상(Numerical aberration)”이란 세포의 일반 염색체 수와 다르게 염색체 수가 변화된 것을 말한다.

(다) “염색분체이상(Chromatid-type aberration)”이란 단일 염색분체가 절단 및 재결합됨으로써 나타나는 구조의 이상을 말한다.

- (라) “염색체이상(Chromosome-type aberration)”이란 두 염색분체가 동일한 위치에서 절단 또는 재결합됨으로써 나타나는 구조의 이상을 말한다.
- (마) “이수성(Aneuploidy)”이란 하나 이상의 염색체에서 상동염색체의 개수가 정상과 다른 성질을 말한다.
- (바) “배수성(Polyploidy)”이란 두 별 이상의 염색체를 가지는 생명체의 성질을 말한다.
- (사) “유사분열지수(Mitotic index)”란 증식정도를 나타내는 지수로서 전체 관찰세포 중 세포분열 중기의 세포 비율을 말한다.
- (아) “갭(Gap)”이란 염색분체(Chromatid)의 폭 보다 작고, 염색분체가 정렬되어 있지 않은 비염색체성 병소(Achromatic lesion)를 말한다.
- (자) “중기 세포(Metaphase cell)”란 세포의 분열단계 중 중기(中期)에 해당하는 과정에 있는 세포를 말한다.
- (차) “딸세포(Daughter cell)”란 한 개의 세포에서 분열한 새로운 세포를 말한다.
- (카) “딸염색체(Daughter chromosome)”란 한 세포가 가지고 있던 염색체가 분열된 딸세포를 위해 그 일부를 전해준 염색체를 말한다.
- (타) “동원체(Centromere, Kinetochore)”란 세포분열 시 염색체에 방추사가 붙어 나누어짐으로써 두 개의 딸세포로 이동할 수 있게 하는 염색체의 특정 부위를 말한다.
- (파) “실험동물(Laboratory animals)”이란 건강한 동물로서 시험을 목적으로 사용되는 품종이 확실한 동물을 말하며, 설치류는 특정병원체부재(Specific pathogen free) 동물을 사용한다.
- (하) “GLP(Good laboratory practice)”란 비임상시험을 위한 우량실험실기준 및 운영 규정으로서 독성시험기관에서 행해지는 시험의 계획, 실행, 점검, 기록 및 보고 등의 시험과정과 방법에 대한 총체적인 사항을 규정한 것을 말한다.

- (거) “용량-반응(Dose-response) 관계”란 화학물질의 노출량과 생체에서 나타나는 건강영향과의 양적-반응 관계를 말한다.
- (너) “신뢰성보증(Quality assurance)”란 시험성적의 신뢰성을 확인하기 위해 운영책임자가 지명하는 자에 의하여 이루어지는 해당 시험 및 시설에 대한 신뢰성보증 관련 업무를 말한다.
- (더) “검체(Specimen)”란 검사나 분석 또는 보관을 위해 시험계로부터 얻어진 것을 말한다.
- (러) “대조물질(Control material)”이란 시험물질과 비교할 목적으로 시험에 사용되는 물질을 말한다.
- (머) “매개물질(Vehicle)”이란 활성을 갖는 화학물질을 투여 시 용매로 사용되는 약효가 없는 물질을 말한다.
- (버) “ADME”란 흡수(Absorption), 분포(Distribution), 대사(Metabolism), 배설(Excretion)의 약어로, 약물이 체내에 투여된 후 여러 주변 조건과 시간의 흐름에 따라 체내에서 이동하며 일어나는 동태를 말한다.
- (서) “UVBCs”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 포유류 골수세포를 이용한 염색체이상시험은 실험동물 중에 따라 다를 수 있지만, 생체 내 대사, 약물 동태 및 DNA 복구 과정의 요인들이 반영된 여러 반응 결과들을 고려한 유전독성의 평가에 기여할 수 있다. 생체 내 분석은 또한 시험관내에서 검출된 유전독성의 추가 조사를 위해 유용하게 사용된다.

4.1.2 포유류 염색체이상시험은 실험동물, 특히 설치류의 골수세포에서 시험물질에 의해 유도된 염색체 구조의 이상을 검출하는데 사용한다. 염색체 구조의 이상은 염색체 및 염색분체의 두 가지 형태일 수 있다. 화학물질에 의해 유도된 주요한 유전독성 이상은 염색분체 형태이지만, 염색체 형태도 발생한다. 염색체 이상과 관련된 결과들은 많은 사람 유전질환의 원인이 되고, 이러한 병변과 관련된 결과들은 종양 유전자 및 종양 억제 유전자의 변화를 유발한다는 상당한 증거가 있으며, 이는 사람 및 실험계에서 암과 관련된다. 배수성은 생체 내에서 염색체이상을 일으킬 수 있다. 하지만 배수성 그 자체의 증가가 잠재적인 수적 이상을 의미하지 않으며 단순한 세포주기의 변화 또는 세포독성을 나타낼 수 있다. 이 시험은 이수성을 측정하도록 설계되지 않았다. 생체 내(in vivo) 포유류 적혈구 소핵시험 또는 시험관 내(in vitro) 포유류 세포 소핵시험은 이수성의 검출을 위해 권장된다.

4.2 초기 고려사항

4.2.1 설치류는 이 시험에서 자주 사용하며, 일부 사례에 있어 다른 종들은 과학적으로 증명될 때에만 적합하게 된다. 골수는 혈관이 많이 생성되는 조직이고 쉽게 분리 및 처리될 수 있는 급속 순환 세포군을 포함하므로 이 시험에서 표적 조직이 된다. 랫드와 마우스 이외의 종을 사용하는 경우 그 과학적 타당성이 보고서에 제시되어야 한다. 설치류 이외의 종들이 사용되는 경우, 골수 염색체 이상의 측정이 다른 적절한 독성시험으로 통합하는 것이 추천된다.

4.2.2 시험물질 또는 그 대사체가 표적 조직에 이르지 않을 것이라는 증거가 있는 경우는 이 시험에 적합하지 않을 것이다.

4.2.3 의도적으로 규정된 목적을 위한 자료의 생성을 위한 혼합물의 시험 가이드라인을 사용하기 전에, 그것이 그 목적을 위해 적절한 결과를 제공할 있는지, 그렇다면 그

4.2.3 이유에 대해 고려하여야 한다. 이런 고려는 혼합물의 시험이 규정으로 필요한 경우에는 해당하지 않는다.

5. 시험 방법

5.1 시험의 원리

5.1.1 실험동물은 적절한 노출 경로로 시험물질에 노출하여야 하고 처리 이후 적절한 시간에 인도적 희생하여야 한다. 인도적 희생에 앞서, 실험동물은 중기-고정제 (예: 콜히친 또는 콜세미드®)로 처리한다. 골수세포에서 얻어진 염색체는 염색하고, 중기 세포는 염색체이상이 분석한다.

5.2 실험 숙련도 조사

5.2.1 시험기관은 <표 1>에 나열한 양성대조물질들 중 최소 2종 이상에 대해 적합한 매개물질(Vehicle)/대조용매와 함께 숙련도시험을 하여 염색체이상 빈도의 보고자료(4.2.1)로부터 기대되는 결과들을 재현할 수 있는 능력을 입증해야만 한다. 이 실험들은 재현성 및 용량반응 증가를 가지며 민감도와 관심 조직(골수)에서 시험계의 역동적 범위를 가지는 용량을 사용해야 하고 실험실에서 수용할 수 있는 채점방법을 사용해야 한다. 이 요구사항은 5.3.1부터 5.3.5까지에서 정의한 대로 사용할 수 있는 표준 데이터베이스와 같은 경험이 있는 실험실에는 적용하지 않는다.

5.3 과거 대조군 자료(Historical Control Data)

5.3.1 숙련도 조사의 과정 중에 실험실은 과거 양성대조(Historical positive control) 범위와 분포, 그리고 과거 음성대조(Historical negative control) 범위와 분포를 확립해야 한다.

5.3.2 과거 음성대조 분포 자료가 처음 수집된 동시에 음성 대조자료들도 그것이 존재하는 곳에서 보고된 대조 자료들과 일치해야 한다. 더 많은 실험자료들이 과거 대조 분포에 더해짐에 따라 동시에 음성 대조자료들도 그 95% 대조한계 범위 내에서 이상적으로 분포하여야 한다. 실험실의 과거 음성대조 데이터베이스는 그 실험실이

5.3.2 음성 대조자료들의 분포를 평가하기 위한 그 실험실의 능력을 보장하기 위해 통계적으로 견고해야 한다. 이 문헌은 최소 10개의 실험이 필수적이지만 적어도 20개의 비교 실험조건에서 수행된 실험으로 구성되는 것이 바람직함을 시사한다. 실험실은 그 자료들이 얼마나 변이를 갖는지 확인하고 그 실험실에서 그 방법이 통제중임을 보이기 위해 대조 차트(예 : C-차트 또는 X-막대 차트(4.2.3))와 같은 품질관리 방법을 사용해야 한다. 표준 자료들(예 : 표준 자료들에서 자료들의 통합과 제외에 관한 기준 및 주어진 실험에 대한 수용 기준)의 구축과 사용에 대한 추가 권장사항들은 이 지침(5.1.1)에서 찾을 수 있다.

5.3.3 실험실이 숙련도 조사 중에(5.2.1) 통계적으로 견고한 음성 대조 분포를 확립하기 위해 충분한 수의 실험을 완료하지 않은 경우(5.3.2), 그 분포는 첫 일반 실험동안 성립될 수 있는 것으로 인정된다. 이런 접근은 이 지침(5.1.1)에서 언급한 권고들을 따라야 하고 이 실험들에서 얻은 음성대조 결과들은 보고된 음성대조 자료들과 일관되어야 한다.

5.3.4 실험 프로토콜의 어떤 변화들도 그 실험실에 현존하는 과거 대조 데이터베이스와 일관성이 유지되는 결과 자료들에 미치는 영향의 관점에서 고려하여야 한다. 주요 불일치들은 전문가 판단으로 이전의 분포와 다르다고 결정하는 새로운 과거 대조군 자료의 구축으로 이어져야 한다(5.3.2 참조). 그 과정 중에 전체 음성대조 데이터베이스는 실제 시험의 수행을 허용할 필요가 없을 수 있으며, 그 이전 데이터베이스 또는 해당 보고 자료들과 일관되게 남아 있는 동시 음성대조값을 보일 수 있도록 제공된다.

5.3.5 음성대조 자료들은 각 실험동물의 구조적 염색체이상(겹 제외)의 발생으로 구성하여야 한다. 동시적인 음성대조군들은 실험실의 과거 음성대조 데이터베이스 분포의 95% 대조 범위 내에서 이상적으로 제어되어야 한다. 동시적인 음성대조 자료들이 95% 제어 범위 밖으로 벗어나는 경우는 이 자료들이 극단적인 특이점이 아닌 이상 과거 대조 분포에 포함을 수용할 수 있을 것이며 이 시험계는 통제 중(5.3.2 참조)인 증거이고 기술적 또는 인적 실패의 증거가 아니다.

5.4 시험방법

5.4.1 동물 종의 선택

- (1) 실험에 일반적으로 사용되는 건강한 젊은 성체 실험동물 계통을 사용해야 한다. 마우스도 적합할 수 있지만, 랫드가 일반적으로 사용된다. 과학적 증거가 보고된 경우 그 밖의 적합한 포유류 종을 사용할 수 있다.

5.4.2 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. 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.
- (3) 실험동물들은 과학적으로 정당화된 경우에만 개별적으로 수용할 수 있다.

5.4.3 동물의 준비

- (1) 건강한 젊은 성체 실험동물(설치류는 비록 약간 늙은 동물들 또한 받아들여지지만 이상적으로 처리 개시 시점에 6~10 주령임)이 일반적으로 사용되고, 대조군과 처리군으로 무작위적으로 할당된다. 각각의 동물들은 인도적인 최소한의 침습적 방법(예 : 벨소리, 꼬리표, 마이크로-칩 또는 생체인식 가능, 귀 또는 발가락 천공은 불가)을 사용하여 고유 식별이 되고 적어도 5일 동안 실험조건에 적응시킨다. 케이지는 위치에 가능한 영향을 최소화하는 방식으로 배열하여야 한다. 양성대조군과 시험물질에 의한 교차오염을 피해야 한다. 연구의 시작 시 동물들의 체중 변이는 최소화하여야 하고 각 성별 체중의 $\pm 20\%$ 를 넘지 않아야 한다.

5.4.4 용량의 준비

- (1) 고체 시험물질은 실험동물에 투여하기 전에 적절한 용매 또는 매개물질에 용해 또는 현탁하거나 먹이나 음용수에 혼합해야 한다. 액체 시험물질은 직접 투여하거나

- (1) 투여 전에 희석할 수 있다. 흡입노출의 경우 시험물질은 그 물리화학적 성질에 따라 가스, 증기 또는 고체/액체상 에어로졸로 투여될 수 있다. 신선한 시험물질의 안정성 자료 확보와 적절한 저장조건을 확보하는 신선한 조제가 이루어져야 한다.

5.4.5 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.
- (3) 과거 또는 보고된 대조군 자료들이 없는 것은 구조적 이상이 없거나 선택된 비정형 용매/매개물질로 인해 유해효과가 유도되었음을 나타내고, 초기시험은 용매/매개물질의 수용을 확립하기 위해 수행하여야 한다.

5.4.6 양성대조군

- (1) 양성대조물질로 처리된 동물군은 일반적으로 각 시험에 포함하여야 한다. 이는 시험 수행의 숙련도를 입증하고 경험적 양성대조 범위를 설정한 경우에는 면제될 수 있다. 동시 양성대조군이 포함되지 않는 경우는 각 실험에 계수 대조(고정 및 비염색 슬라이드)를 포함하여야 한다. 이는 참고 시료들에 적절한 시험의 계수 안에 포함됨으로써 얻어질 수 있으며, 그 시험이 수행된 실험실에서 주기적으로(예, 매 6~18개월) 수행된 개별 양성대조 실험으로부터 얻어지게 된다.
- (2) 양성대조물질의 경우 구조적 염색체이상을 갖는 세포의 빈도를 증가가 확실히 관찰되어야 한다. 양성대조 용량은 그 영향이 확실하지만 코드화된 시료들을 계수기에서 즉시 확인할 수 없도록 선택하여야 한다. 양성대조가 시험물질과 다른 경로 및 다른 처리 일정으로 투여되는 것과, 시료채취는 한 시점에서만 받아들여진다. 또한 적절한 경우 화학물질 부류-관련 양성대조물질의 사용을 고려하여야 한다. 양성대조물질의 예는 <표 1>에 나타냈다.

<표 1> 양성대조물질의 예

물질명 (CAS 번호)
Ethyl methanesulphonate (CAS 번호 62-50-0)
Methyl methanesulphonate (CAS 번호 66-27-3)
Ethyl nitrosourea (CAS 번호 759-73-9)
Mitomycin C (CAS 번호 50-07-7)
Cyclophosphamide (monohydrate) (CAS 번호 50-18-0; (CAS 번호 6055-19-2)
Triethylenemelamine (CAS 번호 51-18-3)

5.4.7 음성대조군

- (1) 음성대조군 동물은 시험물질의 처리를 받지 않는 경우를 제외하고는 매 시료채취 시간마다 포함하여야 하고 그렇지 않으면 처리 군과 같은 방법으로 다루어야 한다.
- (2) 만일 용매/매개물질이 시험물질의 처리에 사용되면 그 대조군은 이 용매/매개물질을 받아야 하지만 일관된 동물 간 변이 및 구조적 이상을 갖는 세포의 빈도가 실험실에서 각 시료채취 시간마다 과거 음성대조 자료로 나타내지면 음성대조의 단지 일회 시료채취만 필요할 수 있다.
- (3) 음성대조에서 일회 시료채취가 사용되는 경우는 그 연구에 사용된 첫 번째 시료채취 시간이어야 한다.

5.4.8 동물의 수와 성별

- (1) 일반적으로 소핵 반응은 암수 동물 간에 유사하고 이것은 구조적 염색체이상에도 또한 사실일 것으로 예상된다. 따라서 대부분의 연구들은 두 가지 성에서 모두 수행할 수 있다. 암수 간의 차이를 보이는 자료들은(예 : 범위-결정 시험을 포함하는 전신 독성, 대사, 생체이용률, 골수독성 등) 두 가지 성 모두의 사용을 권장한다. 이런 경우 두 가지 성 모두에서의 시험 수행은 예를 들어 반복투여독성시험의 일부분으로서 적절할 수 있다. 두 가지 성 모두를 사용하는 경우 요인 설계를 사용하는 것이 적절할 수 있다. 이 디자인을 사용하여 어떻게 분석할 지에 대한 세부사항은 부록에 제시하였다.

- (2) 시험개시 시의 군 크기는 한 가지 성에서, 만약 군당 두 가지 성 모두 사용된다면 각 성별 최소한 다섯 마리의 분석 가능한 동물을 제공하는 것을 목표로 확립하여야 한다. 화학물질에 사람이 노출되면 성별-의존적일 수 있고, 일부 의약품들의 예와 같이 그 시험은 적절한 성별로 수행되어야 한다. 최대 전형적인 동물 요구사항의 안내와 같이, 세 개의 용량 군과 동시에 음성대조군을 갖고 두 개의 시료채취 시간을 갖는 한 개의 골수 시험과, 한 개의 양성대조군(각 군은 단일 성별의 다섯 마리 동물로 구성)은 45마리의 동물을 필요로 할 것이다.

5.4.9 용량 수준

- (1) 만약 용량 선택을 돕기 위해 가능한 기존의 적절 자료들이 없기 때문에 예비 범위-규명 연구가 수행된 경우, 같은 실험실에서 같은 종, 계통, 성별을 가지고 수행하여야 하고 본시험에 사용되는 치료요법도 같아야 한다. 그 시험은 최대허용용량(MTD)를 식별하고자 하는 목적이어야 하고, 시험-제한 독성의 증거가 없이 용인될 최고용량으로 정의되면, 시험기간의 지속시간에 비례(예를 들어 체중 감소를 유발하거나 조혈기계 세포독성을 유발함으로써)하지만, 사망이나 통증, 인도적 희생이 필요한 고통의 증거는 없다.
- (2) 최고 용량은 또한 골수에서 일부 독성을 유발하는 용량으로 정의할 수 있다.
- (3) 독성동태학적 성질의 포화를 나타내거나 장기간 처리 후에 노출의 감소로 이어질 수 있는 해독과정을 유발하는 물질들은 용량-설정 기준에서 제외될 수 있고 사례별로 평가하여야 한다.
- (4) 용량 반응 정보를 얻기 위해 완전한 시험은 음성대조군과 일반적으로 2의 인자에 의하지만 4보다는 크지 않은 최소 3개 용량 수준을 포함해야 한다. 만일 시험물질이 기존의 자료들에 범위-결정 시험에서 독성을 나타내지 않거나 기존 자료들에 의존하는 경우, 단일 투여의 가장 높은 용량은 체중 kg당 2,000 mg이어야 한다. 하지만 만약 시험물질이 독성을 유발한다면 MTD는 가장 높은 투여 용량 및 사용된 용량 수준은 거의 또는 전혀 독성을 나타내지 않은 용량의 최대치부터 범위를 바람직하게 포함해야 한다. 표적 조직(골수) 독성이 모든 시험의 용량 수준에서 관찰되는 경우 비독성 용량에서의 추가실험이 권장된다. 더욱 완벽하게 정량적 용량-반응 정보를 특정화하려는 시험들은 추가 용량 군을 필요로 한다. 특정 요구사항이 적용되는 시험물질의 경우(예 : 사람 의약품)에는 여러 가지 제한들이 있을 수 있다.

5.4.10 제한 시험(Limit test)

- (1) 만일 용량 범위-탐색 실험들, 또는 관련 동물 계통의 기존 자료들이 적어도 한계용량(아래 설명한)의 치료법이 무독성영향관찰을 나타내고, (골수증식의 비억제 또는 기타 표적조직 세포독성의 증거를 포함), 시험관내(in vitro) 유전독성 시험 또는 구조적으로 관련된 물질들로부터의 자료들에 근거한 유전독성이 예상되지 않는다면, 세 가지 용량 수준을 사용한 완전한 연구의 필요를 고려하지 않을 수 있으며, 그 시험물질이 표적 조직(골수)에 도달한 것에 대한 증명을 제공한다. 이런 경우 제한 용량에서 단일 용량 수준이 충족될 수 있다. 14일 이상의 투여기간 중에 제한 용량은 매일 체중 kg당 1,000 mg이다. 14일 투여기간 중에 제한 용량은 매일 체중 kg당 2,000 mg이다.

5.4.11 용량 투여

- (1) 사람에서 예상되는 경로는 시험법을 설계할 때 고려하여야 한다. 따라서 급식, 음수, 국소 피하, 정맥, 경구(위관), 흡입, 기관내 또는 주입법과 같은 노출경로를 선택할 수 있다. 어떤 경우에도 그 경로는 표적 조직의 적절한 노출을 보장하기 위해 선택해야 한다. 복강 내 주사는 일반적으로 사람 노출의 의도된 경로가 아니므로 권장되지 않고, 특정 과학적 정당성과 함께 사용해야만 한다. 만약 시험물질이 식이 또는 식수에 혼합되면, 특히 단일 투여인 경우, 음식과 물 섭취 간의 지연에 주의해야 하고 시료채취는 그 효과를 검출하기에 충분해야 한다. 위관 또는 주사로 한 번에 투여될 수 있는 액체의 최대 부피는 실험동물의 크기에 의존한다. 그 부피는 최대 체중 g당 2 ml가 사용될 수 있는 수용액인 경우를 제외하고는 통상 체중 100 g당 1 ml를 초과하지 않아야 한다. 이보다 큰 부피의 사용은 정당성이 있어야 한다. 고농도에서 일반적으로 악화되는 효과를 나타내게 될 자극성 또는 부식성 시험물질을 제외하고는, 시험 부피의 가변성은 모든 용량수준에서 체중과 관련된 일정부피의 투여를 보장하기 위해 농도를 조정함으로써 최소화해야 한다.

5.4.12 처리 일정

- (1) 시험물질은 일반적으로 단일처리로 투여되지만, 대량 투여를 용이하게 하기 위해 (예 : 같은 날에 적어도 2~3시간으로 구분하여 두 번 이상 처리) 분할 용량으로 처리할 수 있다. 이러한 상황에서 시험물질을 흡입으로 투여하는 경우 시료채취 시간은 마지막 투여 또는 노출의 종료시간에 따라 정해야 한다.

- (2) 이 시험에서 반복-용량 프로토콜에 적합하게 사용가능한 자료들은 거의 없지만 반복-용량 독성시험과 통합하는 것이 바람직한 상황에서는 독성 용량에서 발생할 수 있는 염색체 손상 유사분열 세포의 손실을 피하기 위해 주의해야 한다. 이런 통합은 제한 용량 이상의 최고 용량에서 받아들여지고 한 용량군은 처리기간 동안 제한 용량이 투여된다. 소핵시험(TG 474)은 다른 시험들과의 통합이 요구되는 경우 염색체이상에 대한 선택의 생체 내(in vivo) 시험으로 간주해야 한다.
- (3) 골수 시료는 단일 처리 이후 두 개의 분리된 시간에 취해야 한다. 설치류의 경우 첫 번째 시료채취 간격은 1.5 정상 세포주기 시간(후자는 일반적으로 처리기간 이후 12~18 시간이 됨)을 완료하는데 필요한 시간이어야 한다. 세포주기 동력학에 미치는 그 영향이 염색체이상 검출을 위한 최적시간 뿐만 아니라 시험물질(들)의 흡수 및 대사에 필요한 시간에 영향을 미칠 수 있으므로, 이후 시료 채취는 첫 시료채취 시간의 24시간 후가 권장된다. 첫 시료채취 시점에서 모든 용량군을 처리해야 하고 시료를 분석을 위해 수집되지만, 이후 시료채취 시간에서 단지 최고 용량만 투여할 필요가 있다. 1일 이상의 용량법은 과학적 정당성을 기반으로 사용되고, 한 시료채취 시간은 일반적으로 최종처리 이후 대략 1.5 정상 세포주기 길이까지를 사용한다.
- (4) 처리 이후 및 시료 수집 전에, 실험동물들은 적절한 용량의 중기-고정제(예 : 콜세미드® 또는 콜히친)의 적당한 용량으로 복강 내 주입되고, 시료는 이후 적절한 간격으로 수집한다. 마우스의 경우 이 간격은 수집 전 대략 3~5시간이고 랫드에서는 2~5시간이다. 세포는 골수로부터 수집되어 증가, 고정 및 염색되고 염색체이상을 분석한다.

5.4.13 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. 투여 기간 동안 적어도 하루에 두 번은 모든 실험동물들의 이환율과 사망률이 관찰하여야 한다. 모든 실험동물들은 시험 개시 시, 반복-투여 시간 동안은 적어도 1주일에 한 번 및 인도적 희생 시에 계체해야 한다. 적어도 1주일간 지속되는 시험에서는 사료섭취량의 계측은 적어도 1주 단위로 시행하여야 한다. 만약 시험물질이 식수를 통해 투여되면 물 섭취량은 매 물을 갈아줄 때 및 적어도 1주일에 한 번은 계측하여야 한다. 과도한 독성의 비-치사 징후를 보이는 실험동물

들은 시험기간이 종료되기 전에 인도적으로 희생시켜야 한다.

5.4.14 표적 조직 노출

- (1) 혈액 시료는 보증 및 기타 노출 자료들이 존재하지 않는 경우 시험물질이 골수에 노출되었음을 증명하기 위해 시험물질의 혈장에서 시험물질을 검출하기에 적절한 시간에 채취하여야 한다.

5.4.15 골수 및 염색체 표본 제작

- (1) 인도적 희생 이후 즉시 골수 세포들은 실험동물의 대퇴골 또는 경골에서 채취되고 저장성 용액에 노출하여 고정시킨다. 중기 세포들은 이후 슬라이드에 도포하고 확립된 방법을 이용하여 염색한다.

5.4.16 분석

- (1) 양성 및 음성대조군을 포함하는 모든 슬라이드들은 분석 이전에 독립적으로 코딩해야 하고 처리 조건을 인식하지 못하도록 무작위적으로 점수화한다.
- (2) 유사분열지수는 모든 처리 동물들(양성대조군 포함), 미처리 또는 매개물질/용매 음성대조 동물들에서 적어도 실험동물 당 1,000개의 세포들에서 세포독성을 측정함으로써 결정하여야 한다.
- (3) 적어도 200개의 중기세포들은 각 실험동물에서 갭(gap)을 포함 및 제외하는 구조적 염색체이상이 분석하여야 한다. 하지만 실험실의 과거 음성대조 데이터베이스가 평균 배경 구조 염색체이상 빈도가 1% 미만으로 나타난 경우는 추가 세포의 계수에 주의해야 한다. 염색분체 및 염색체-형 이상은 별도로 기록되고 하위 유형(분절, 교환)을 분류하여야 한다. 실험실에서 사용하는 절차들은 가능한 경우 염색체이상의 분석이 잘 훈련된 계수자와 검토자에 의해 수행됨을 보증해야 한다. 슬라이드 제작과정은 종종 염색체의 손실과 함께 중기 비율의 파괴로 이어지고, 따라서 계수된 그 세포들은, 그 중에서 염색체의 반수체 수가 n 인 경우, $2n \pm 2$ 이상인 중심체 수를 포함해야 한다.

6. 시험결과 및 보고

6.1 결과의 처리

6.1.1 각 동물 자료들은 표의 형태로 제시되어야 한다. 중기 세포들이 계수된 숫자인 유사분열지수는 중기 세포 당 이상의 수이고 구조적 염색체이상을 갖는 세포들은 각 동물마다 평가하여야 한다. 구조적 염색체이상의 또 다른 유형은 처리 및 대조군들에서 그 수와 빈도를 나열하여야 한다. 배수 세포 및 배가성 염색체를 갖는 세포뿐만 아니라 갭(gap)은 별도로 기록하여야 한다. 갭(gap)의 빈도는 기록되지만 일반적으로 전체 구조적 염색체이상 빈도의 분석에 포함하지는 않는다. 성별 간의 반응에 차이의 증거가 없으면 그 자료들은 통계 분석을 위해 조합할 수 있다. 동물 동성 및 임상증상의 자료들은 또한 보고하여야 한다.

6.2 수용 기준

6.2.1 시험 수용가능성을 결정하는 기준은 다음과 같다.

- (1) 동시 음성대조 자료들은 실험실 과거 대조 데이터베이스에 추가될 수 있는 것으로 간주한다.
- (2) 동시 양성대조 자료들 또는 계수 대조군들은 과거 양성대조 데이터베이스에 추가될 수 있으며 음성대조와 비교하여 통계적으로 유의한 증가를 나타낸다.
- (3) 적절한 용량 및 세포의 수를 분석한다.
- (4) 최고 용량의 선택을 위한 기준은 5.4.9항에 기술한 내용과 일치한다.

6.3 결과의 평가 및 해석

6.3.1 다음의 경우 모든 수용기준을 충족하고, 시험물질은 확실히 양성으로 고려한다.

- (1) 처리군 중 적어도 하나가 동시 음성대조군에 비해(갭은 제외) 구조적 염색체이상을 가진 세포의 빈도가 통계적으로 유의한 증가를 나타냄.

(2) 이러한 증가가 적절한 추세 시험의 평가 시에 적어도 한 개의 채취 시간에서 용량-관련임.

(3) 이 결과들 모두가 표준 음성대조 자료들(예 : Poisson-based 95% 대조 한계치)의 분포 외측에 존재함.

6.3.2 단지 최고용량이 특정 시료채취 시간에서 수행되는 경우는 한 시험물질은 동시 음성대조와 비교하여 통계적으로 유의한 증가가 있는 경우이면 명확한 양성으로 간주하고 그 결과는 과거 음성대조 자료들(예 : Poisson-based 95% 대조 한계치)의 분포 외측에 존재한다. 적절한 통계 방법에 대한 권장은 문헌(13)에서 찾을 수 있다. 용량-반응 분석을 수행할 때 적어도 세 개의 처리 용량군이 분석하여야 한다. 통계적 시험은 실험단위로서 그 실험동물을 사용해야 한다. 염색체이상시험에서 양성 결과들은 한 시험물질이 시험 동물종의 골수에서 구조적 염색체이상을 유발함을 나타낸다.

6.3.3 다음의 경우 모든 수용기준을 충족하고, 시험물질은 확실히 음성으로 고려한다.

(1) 처리군 모두가 동시 음성대조와 비교할 때 구조적 염색체이상(겹 제외)의 빈도가 통계적으로 유의한 증가를 나타내지 않고, 적절한 동향 시험으로 평가될 때 어느 시료채취 시점에서도 용량-관련 증가가 없으며, 모든 결과가 과거 음성대조 자료들(예 : Poisson-근거 95% 대조 한계치)의 분포 안에 존재하고, 시험물질에의 골수 노출이 일어남.

6.3.4 가장 적절한 통계적 방법에 대한 권장사항은 문헌(13)에서 찾을 수 있다. 시험물질이 골수에 노출되었다는 증거는 유사분열지수의 감소 또는 시험물질의 혈장 또는 혈액 수준의 측정을 포함한다. 정맥 내 투여의 경우 노출의 증거는 필요하지 않으며, 대신 같은 경로 및 같은 종을 사용한 독립적인 시험에서 ADME 자료가 골수 노출을 설명하기 위해 사용될 수 있다. 이 시험 조건에서 음성 결과들은 시험물질이 시험된 종의 골수에서 구조적 염색체이상을 유발하지 않는 것을 나타낸다.

6.3.5 확실한 양성 또는 음성 반응의 증명은 요구되지 않는다.

6.3.6 그 반응이 확실히 음성 또는 양성인 경우 및 결과의 생물학적 관련성을 확립하는 것을 돕기 위한 경우(예 : 약하거나 경계선 증가), 그 자료들은 전문가의 판단 및/

또는 완료된 기존 실험의 추가 조사로 평가하여야 한다. 일부의 경우, 더 많은 세포를 분석하거나 변경된 실험조건을 사용한 반복실험이 유용할 수 있다.

6.3.7 드문 경우, 추가 조사의 이후에도 그 자료가 시험물질이 양성 또는 음성인 결과는 배제할 것이고, 따라서 그 시험도 의양성으로 결론날 것이다.

6.3.8 전체 중기 중에서 배수체 및 배가성 중기의 빈도는 각각 기록하여야 한다. 배수체 또는 배가성 세포수의 증가는 그 시험물질이 유사분열 또는 세포주기 진행의 잠재적 억제를 의미할 수 있다.

6.4 시험 보고서

6.4.1 시험보고서는 다음의 정보를 포함해야 한다.

(1) 요약

(2) 시험물질

(가) 구입처, 롯트 번호, 가능한 경우 사용제한 날짜

(나) 알려진 경우 시험물질의 안정성

(3) 단일 구성 물질

(가) 물리적 성상, 수용해도 및 물리화학적 성질 관련 추가

(나) IUPAC 또는 CAS명, CAS번호, SMILES 또는 InChI 코드, 구조식, 순도, 적절하고 실제로 적합한 불순문의 화학적 식별자료 등

(4) 복합 구성 물질, UVBCs 및 혼합물

(가) 화학적 식별, 정량적 발생 및 구성성분의 물리화학적 성질에 근거한 특징

(5) 시험물질 준비

(가) 매개물질의 선택에 대한 타당성

(나) 알려진 경우 용매/매개물질 중 시험물질의 용해도 및 안정성

(다) 식이, 식수 또는 흡입 제제의 제조

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

(6) 실험동물

(가) 사용된 종/계통 및 사용의 타당성

(나) 동물의 수, 연령 및 성별

(다) 구입처, 사육 조건, 식이 등

(라) 실험동물을 식별하는 고유의 방법

(마) 단기 시험의 경우, 시험의 시작과 종료 시 각 실험동물의 체중; 1주일 이상의 장기 시험의 경우 시험기간 중 각각의 체중 및 먹이소비량. 체중 범위, 각 군의 평균 및 표준편차가 포함되어야 한다.

(7) 실험조건

(가) 양성 및 음성(매개물질/용매) 대조군

(나) 수행된 경우 농도설정 시험의 자료들

(다) 용량 수준 선택을 위한 이론적 근거

(라) 시험물질 조제에 관한 세부사항

(마) 시험물질의 투여에 관한 세부사항

(바) 투여의 경로 및 기간을 위한 이론적 근거

(사) 시험물질(들)이 일반 순환 또는 골수에 도달하는 것을 확인하는 방법들

(아) 적용가능한 경우 식이/음수 시험 화학물질 농도(ppm) 및 소비로부터 계산된 실제 용량(매일 체중 /kg 당 mg)

(자) 먹이 및 수질에 관한 세부사항

(차) 인도적 희생의 방법

(카) 진통제(사용된 경우)의 방법

(타) 처리에 관한 자세한 설명, 채취 일정 및 선택의 정당성

(파) 슬라이드 제작 방법

(하) 독성 측정의 방법

(거) 중기 고정 화학물질의 확인, 그 농도, 채취 전 투여용량 및 시간

(너) 시료 분리 및 보존 절차

(더) 이상의 계수 기준

(러) 실험동물당 분석된 중기세포의 수 및 유사분열지수 결정을 위해 분석된 세포의 수

(머) 연구의 수용 기준

(버) 연구내용을 고려한 양성, 음성 또는 미결정의 기준

(8) 결과

(가) 독성의 징후를 포함한 시험기간 이전 및 시험기간 중의 실험동물 조건

(나) 각 실험동물에 개별적으로 지정된 유사분열지수

(다) 각 실험동물에 개별적으로 지정된 이상 및 이상세포의 종류와 수

(라) 군당 이상의 총 수와 평균 및 표준편차

(마) 군당 이상 세포의 수와 평균 및 표준편차

(바) 측정된 경우, 배수체 및/또는 배수성 세포의 빈도를 포함한 배수성의 변화

(사) 가능한 경우, 용량-반응 관계

(아) 통계 분석 및 적용된 방법

(자) 골수의 노출 발생을 지원하는 자료들

(차) 동시적 음성대조 및 양성대조 자료 및 범위, 평균 및 표준편차

(카) 과거 음성 및 양성대조 자료와 범위, 평균, 표준편차, 해당 시간 주기 및 관찰의 수와 더불어 분포에 대한 95% 대조 한계

(타) 양성 또는 음성 반응에 대한 기준

(9) 결과 토론

(10) 결론

(11) 참고문헌

7. 참고문헌

- (1) OECD, “Draft Introduction to the OECD guidelines on genetic toxicology testing and guidance on the selection and application of assays”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, OECD Publishing, Paris. Under preparation.
- (2) Adler, I.D. (1984), “Cytogenetic Tests in Mammals”, in Mutagenicity Testing: A Practical Approach, Venittand, S., J.M. Parry (eds.), IRL Press, Washington, DC, pp. 275–306.
- (3) Preston, R.J. et al. (1987), Mammalian in vivo cytogenetic assays. Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells, Mutation Research, Vol. 189/2, pp. 157–165.
- (4) Richold, M. et al. (1990), “In Vivo Cytogenetics Assays”, in Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 115–141.
- (5) Tice, R.R. et al. (1994), Report from the working group on the in vivo mammalian bone marrow chromosomal aberration test, Mutation Research, Vol. 312/3, pp. 305–312.
- (6) Adler, I.D. et al. (1998), Recommendations for statistical designs of in vivo mutagenicity tests with regard to subsequent statistical analysis, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 417/1, pp. 19–30.
- (7) Ryan, T.P. (2000), Statistical Methods for Quality Improvement, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.
- (8) Hayashi, M. et al. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 723/2, pp. 87–90.

- (9) Hayashi, M. et al. (1994), In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay, Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, Vol. 312/3, pp. 293-304.
- (10) Fielder, R.J. et al. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in in vivo mutagenicity assays, Mutagenesis, Vol. 7/5, pp. 313-319.
- (11) OECD (2000), "Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, N°19, OECD Publishing, Paris.
- (12) Pacchierotti, F., V. Stocchi (2013), Analysis of chromosome aberrations in somatic and germ cells of the mouse, Methods in Molecular Biology, Vol. 1044, pp. 147-163.
- (13) Lovell, D.P. et al. (1989), "Statistical Analysis of In Vivo Cytogenetic Assays", in Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS SubCommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184-232.

<부록> 생체 내(In vivo) 염색체이상시험에서 성별 차이를 확인하기 위한 요인 설계 및 분석

1. 이 설계에서, 최소 40마리의 동물들을 사용한 설계의 결과를 내는데 각 농도 수준에서 최소 다섯 마리의 수컷과 다섯 마리의 암컷이 시험되어야 한다(20마리의 수컷과 20마리의 암컷에 관련된 양성대조를 추가).
2. 더욱 단순한 요인 설계 중 하나인 그 설계는 성별 및 농도수준이 주 영향인 two-way ANOVA에 상응한다. 그 자료들은 R을 이용한 것 뿐만 아니라 SPSS, SAS, STATA, Genstat 와 같은 많은 표준 통계 소프트웨어 패키지를 사용하여 분석할 수 있다.
3. 그 분석은 성별, 농도 및 성별과 농도간의 상관관계와 관련된 데이터 셋의 변화를 분할한다. 각 용어들은 동일 농도에서 주어진 동일성별의 동물 군에서 복제 동물들 간의 변동성의 추정 에 대해 시험된다. 근본적인 방법론의 자세한 내용은 많은 표준 통계 교과서들 및 통계 패키지 와 함께 제공되는 ‘도움말’에서 얻을 수 있다.
4. 그 분석은 ANOVA 표¹⁾에서 성 x 농도 상호작용 항을 검사함으로써 진행된다. 상당한 작용 기간의 부재 시 성 또는 농도 수준에 걸쳐 결합된 값들은 ANOVA의 군 변동 기간 내에 모아진 것에 근거한 수준 간의 유효한 통계적 검사를 제공한다.
5. 그 분석은 한 시험을 선형 및 농도 수준에 따라 반응하는 2차 대조로 제공하는 대조의 농도 변이 간 추정치를 분할함으로써 계속된다. 중요한 성별 x 농도 상호작용이 있는 경우 이 용어는 또한 선형 x 성별 및 2차 x 성별 상호작용 대조로 분할될 수 있다. 이 용어들은 그 농도 반응이 두 가지 성별에 상응하는지 또는 두 성별 간에 차이나는 반응이 있는지의 시험을 제공한다.
6. 군 가변성 안에 모여진 것들의 추정은 평균 간의 차이에 대한 쌍대비교(pair-wise) 시험을 제공하는데 사용될 수 있다. 이러한 비교들은 두 성별의 평균간 및 음성대조 수준에 대한 비교와 같은 서로 다른 농도 수준의 평균 간에 만들어질 수 있다. 상당한 상호 비교가 있는 경우는 한 성별에서 다른 농도들의 평균과 동일 농도에서 성별의 평균 간에 만들어 질 수 있다.

1) 일반 선형 모델(GLMs)을 사용하는 것과 같은 모델링 접근을 수행하는 통계학자들은 다르지만 유사한 방법으로 분석에 접근할 수 있지만 반드시 컴퓨터 세대 이전에 개발된 통계로 계산하는 알고리즘적 접근을 거슬러 올라가는 전통적인 ANOVA 표를 유도할 필요는 없다.

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