

KOSHA GUIDE

T - 6 - 2017

화학물질의 생식 및 발생독성
스크리닝 시험 기술지침

2017. 10.

한국산업안전보건공단

안전보건기술지침의 개요

- 작성자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 정 용 현
- 개정자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 정 용 현
- 개정자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 정 용 현
- 개정자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 정 용 현

○ 제정 경과

- 2013년 11월 산업독성분야 제정위원회 심의
- 2015년 5월 산업독성분야 제정위원회 심의(개정, 법규개정조항 반영)
- 2016년 10월 산업독성분야 제정위원회 심의(개정, 법규개정조항 반영)
- 2017년 9월 산업독성분야 제정위원회 심의(개정, 법규개정조항 반영)

○ 관련규격 및 자료

- 국립환경과학원고시 제2017-4호(화학물질의 시험방법에 관한 규정)
- OECD Guideline for the testing of chemicals
(TG 421, Reproduction/Developmental Screening Test)(2016)

○ 관련법규, 규칙, 고시 등

- 산업안전보건법 제39조(유해인자의 관리 등)
- 고용노동부고시 제2015-74호(화학물질의 유해성·위험성 시험 등에 관한 기준)
- 고용노동부고시 제2016-19호(화학물질의 분류·표시 및 물질안전보건자료에 관한 기준)

○ 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 관련규격 및 자료, 법규 등에 관하여 최근 개정본이 있을 경우에는 해당 개정본의 내용을 참고하시기 바랍니다.

공표일자 : 2017년 10월 24일

제 정 자 : 한국산업안전보건공단 이사장

화학물질의 생식 및 발생독성 스크리닝 기술시험 지침

1. 목 적

이 지침은 산업안전보건법 제39조(유해인자의 관리 등), 화학물질의 유해성·위험성시험 등에 관한 기준(고용노동부고시 제2015-74호)에 따라, 화학물질이 생식 및 발생에 미치는 영향을 평가하기 위한 시험 지침을 제정하고자 함.

2. 적용범위

- (1) 이 지침은 산업안전보건법 제39조(유해인자관리)에 의거한 산업화학물질이 생식 및 발생에 미치는 영향을 평가하기 위한 시험 방법 및 결과보고서의 작성에 적용한다.
- (2) 이 지침은 생식선의 기능(Gonadal function), 교미 행동(Mating behavior), 수태(Conception), 태아의 발육, 분만과 같은 암컷과 수컷의 생식 능력에 대한 시험 물질의 영향과 관련된 정보를 얻는데 그 목적이 있다.
- (3) 이 지침은 화학물질의 독성학적 특성을 평가하는 초기 단계에서, 생식 및 발육에 대해 예상되는 초기 정보를 제공하기 위한 스크리닝 시험 지침서로 사용할 수 있다.
- (4) 이 지침은 광범위한 생식 및 발육 시험을 위한 투여 범위(Dose range)를 찾는 시험 지침으로 사용할 수 있다.
- (5) 이 시험 지침은 생식 및 발육과 관련 있는 모든 정보를 제공하지는 않는다. 특히 이 시험 지침은 출생 전 노출이 출생 후 발현되거나, 출생 후 노출되는 동안 발생할 수 있는 영향을 찾기 위해서는 제한적인 방법이다.
- (6) 비교적 적은 투여군 동물의 수, 종말점의 선택, 짧은 시험 기간 때문에, 실제 노출이 최대무영향용량보다 적은 경우에는 어느 정도의 확신은 줄 수 있다.

- (7) 다른 생식 및 발육 독성 시험에서 얻은 데이터가 없는 경우, 시험물질에 의한 긍정적인 결과(Positive data)는 초기 위험 평가에서 유용하게 사용될 수 있으며, 추가 시험의 필요성 및 시기를 결정할 때 사용될 수 있다.
- (8) 이 지침은 시험물질을 경구투여(Oral administration)하는 것으로 가정하여 설정하였다.

3. 정 의

- (1) 이 지침에서 사용하는 용어의 뜻은 다음과 같다.

(가) 생식 독성(Reproduction toxicity)

차세대에 대한 유해한 영향 및(또는) 암수의 생식 기능 장애 혹은 능력 장애.

(나) 모체 독성(Maternal toxicity)

직접 혹은 간접적으로 나타나는 수태한 암컷에 대한 부작용.

(다) 번식능 장애(Impairment of fertility)

수컷 혹은 암컷의 생식 기능 혹은 능력 장애.

(라) 발생 독성(Developmental toxicity)

차산자의 출생 전, 주산기 그리고 출생 후에 관찰되는 구조적 혹은 기능적 장애를 나타내는 생식 독성의 징후.

(마) 무영향농도(NOAEL: No Observed Adverse Effect Level)

시험물질이 투여되었을 때 악영향을 나타내지 않는 농도

4. 시험의 준비

4.1 시험 동물

시험에 사용되지 않은 건강하고 임신 경험이 없는 랫드를 사용한다. 시험에 사용되

는 동물들의 무게 차는 최소로 하고, 동물 개체 무게와 각 성의 평균 무게와의 차는 $\pm 20\%$ 이하로 한다.

4.2 사육조건

사육실은 온도가 $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, 습도가 30~70%가 유지되도록 한다. 이상적인 상대 습도는 50 ~ 60% 다. 사육은 암·수를 구별하여 실시하며 각 개체의 상태 관찰이 용이하도록 밀도가 높지 않도록 한다. 조명은 명/암이 12/12시간이 되도록 조절하며, 사료와 물을 적절히 공급한다. 수태한 암컷은 한 마리씩 케이지에 두고, 깔집을 공급해야 한다. 그 밖의 동물실 환경조건은 일반적인 환경기준치에 따른다.

4.3 시험물질

시험 물질의 최대 1회 경구 투여량은 수용액의 경우 2 ml/100 (체중), 비수용액의 경우 1 ml/100 g(체중)을 초과하면 안 된다. 사료 혹은 음수를 통해 투여되는 경우 동물의 체중 당 일정한 투여량을 적용한다.

4.4 시험군의 구성 및 투여농도 설정

최소 3개의 투여군과 1개의 대조군으로 각 군당 암수 10마리(수태한 암컷의 최소수는 8마리)로 구성한다.

급성 독성 시험 혹은 반복 투여독성 시험 결과에 근거해, 투여농도를 결정한다. 시험 화합물 혹은 관련 있는 물질에 유용한 모든 독성 및 역학 데이터를 고려한 후 투여농도를 선택한다. 독성 영향은 유발하지만 죽거나 심한 고통은 주지 않도록 최대 투여농도를 선택해야 한다. 2~4배의 공비를 두고, 투여농도를 줄이는 것이 이상적이다. 용량간격이 대단히 큰 경우(즉, 공비가 10 이상), 최저용량 시험군을 하나 더 둔다. 시험 물질을 투여할 때 용매를 사용하는 경우, 사용된 최대용량의 용매를 대조군에게 투여한다.

경구로 1회 투여농도가 최소 1,000 mg/kg/day이거나 동일한 양의 시험물질을 사료 혹은 음수에 첨가·투여하여 어떠한 독성 영향도 발견할 수 없거나, 구조적으로 관

런 있는 화합물에서 얻은 데이터를 근거해 독성이 발견되지 않는 경우에는 한계시험을 진행 할 수 있다.

5. 시험방법

5.1 원리

수컷은 번식력과 정자형성과정(Spermatogenesis)에 대한 영향을 평가하기 위해서 교미 전 최소한 2주, 교미 기간, 교미 후 2주 동안 투여한다. 암컷은 교미 전 2주, 수태 시기, 수태 기간, 분만 후 적어도 4일 이상, 부검 전 날을 포함하여 전 시험기간 동안 단계적 용량의 시험물질을 각 군에 투여한다. 이 시험을 통해 수태부터 출산 후 4일까지, 차산자의 성장 및 발생, 수태능, 번식능, 모체 및 수유 행동에 대해 예상되는 시험물질의 영향을 관찰한다.

5.2 교미 및 시험물질 투여

(1) 투여방법

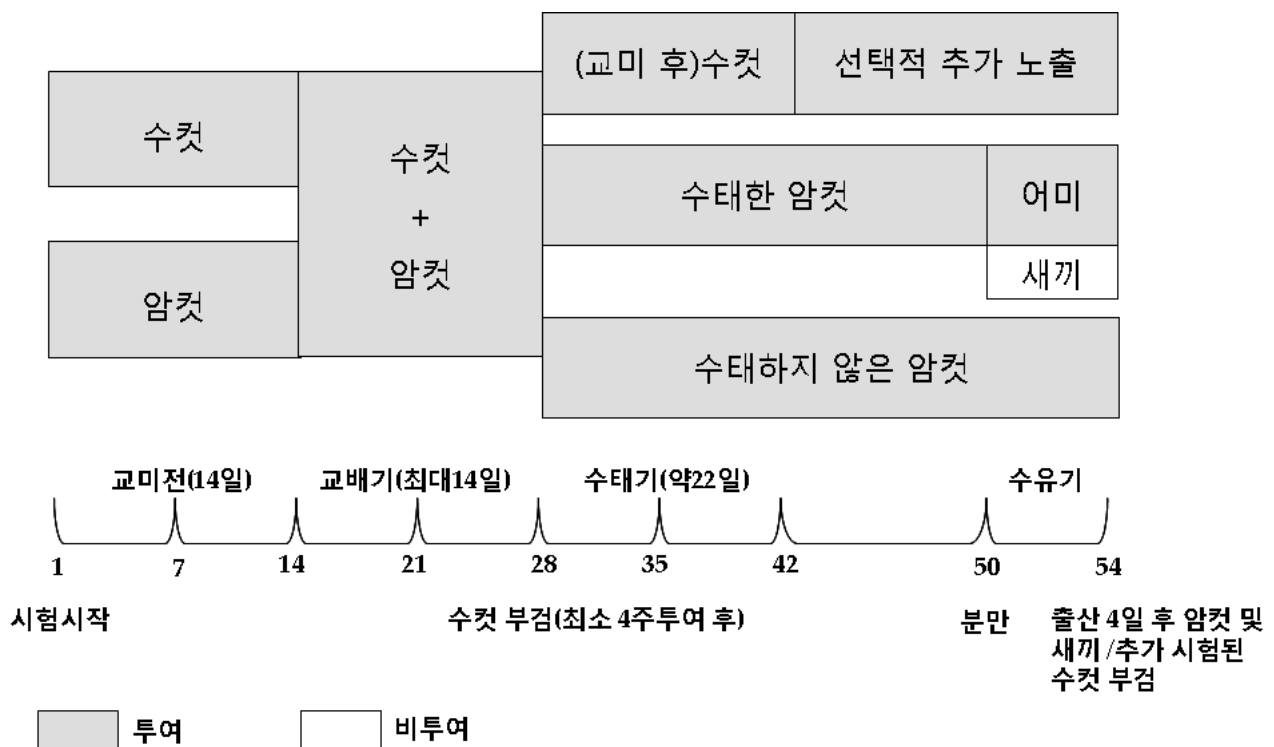
위관내주입법을 사용하여 경구 투여한다. 사료 혹은 음수를 통해 시험물질을 투여할 수도 있다. 위관내주입법으로 투여되는 물질은 매일 같은 시간에 투여해야 하고, 동물의 체중 당 일정한 양으로 투여하기 위해 적어도 1주일에 한번은 각 시험동물의 체중을 측정하여야 한다.

(2) 투여기간

최소 5일 동안 순화 후, 교미 2주 전부터 수컷과 암컷에게 시험 물질을 투여한다. 투여 시기는 시험동물이 성숙이 완료되는 시점으로 SD 랫드의 경우 10주령, Wistar 랫드의 경우 12주령이 적당하다. 교배기, 교미 후 28일 동안 그리고 분만 후 수유기에도 투여를 계속한다.

(3) 교미

교미는 일반적으로 암수 1:1로 진행하고 정자 혹은 질전(Vaginal plug)이 관찰되면 수태 '0'일로 정의한다. 출산일은 분만 후 0일로 정의한다. 짝짓기가 실패한 경우, 암컷을 같은 군의 생식 능력이 있는 것으로 증명된 수컷과 다시 교미시킬 수 있다.



5.3 관찰사항

시험 기간 동안, 적어도 하루에 1번 같은 시간에 임상증상을 관찰하고, 독성 징후가 관찰됐을 때는 더 자주 관찰해야 한다. 행동 변화, 분만이 어렵거나 지연되는 징후, 폐사를 포함한 모든 독성 징후를 시간 및 기간을 포함하여 기록한다.

임신 0일부터 계산된 수태기간을 계산하고, 분만 후 24시간(분만 후 0일 혹은 1일) 및 분만 4일 후 생존한 차산자, 사망한 차산자, 작은 차산자 수 및 성별을 조

사하고 체중 및 어미와 차산자 모두 이상행동을 기록한다.

(1) 체중 및 사료/음수 섭취량

투여 첫날, 수컷과 암컷의 체중을 측정 한 후, 시험이 끝날 때까지, 적어도 1주일에 1번 체중을 측정한다. 수태 0일, 7일, 14일, 20일 후와, 분만 후 24시간(분만 후 0일 혹은 1일) 내에 그리고 분만 후 4일에 암컷의 체중을 측정한다. 사료 섭취량은 교미 후, 수태 기간, 수유 기간 동안 적어도 1주일에 1번 측정하고 시험 물질이 음수를 통해 투여되는 경우 이 기간 동안 음수 섭취량도 측정해야 한다.

(2) 병리학적 관찰

시험동물 부검 시, 모든 이상 혹은 병리학적 변화 또는 생식 기관(착상수 및 황체수 등)을 조사해야 한다. 모든 동물 성체의 기관 및 고환과 부고환 무게를 측정하고, 특히 육안적 병변이 보이는 난소, 고환, 부고환, 보조 생식 기관 등은 고정·보관한다. 고환과 부고환의 고정은 Bouin 고정액을 사용한다. 고농도 시험군과 대조군 동물의 난소, 고환, 부고환에 대해 상세한 조직병리학검사를 실시하고 필요하면 다른 투여 시험군 또는 다른 장기도 조사한다.

6. 시험결과 및 보고

6.1 결과의 처리

통계 분석을 사용하는 경우, 이 통계 분석은 조사된 변수 분포에 적합해야 하고, 시험을 시작하기 전에 선택해야 한다. 시험군의 크기가 작기 때문에, 시험을 이해하는데 도움을 받기 위해, 잘 알려진 대조군 데이터(즉, 한배 새끼 크기)를 사용하면 유용하다.

6.2 결과의 평가

시험물질 투여군과 대조군과의 관계, 이상의 발생 및 심각성뿐만 아니라, 전체적 이

상 영향, 확인된 표적기관, 불임, 임상적 이상, 영향 받은 생식 및 수태 능력, 체중 변화, 폐사에 대한 영향, 기타 모든 독성 영향이 평가에 포함된다. 수컷에 대한 투여 기간이 짧기 때문에 수컷의 생식에 대한 영향을 평가하는 경우, 번식력 자료와 함께 고환과 부고환의 조직병리학적 결과를 반영한다.

6.3 시험 결과의 보고

시험보고서는 다음의 항목을 포함한다.

(1) 시험기관의 명칭 및 소재지

(2) 시험책임자 및 담당자 성명

(3) 시험 및 대조 물질 정보

(가) IUPAC 또는 CAS 번호와 같은 화학물질명

(나) 시험물질의 순도 또는 실험용 혼합물(무게 %로 나타냄)의 배합, 물리적 특성 및 순도

(다) 시험의 수행과 관련된 시험물질의 물리적 상태(기체, 고체, 액체 등), pH, 안정성, 수용해도, 물리화학적 성상

(라) 물이 아닌 용매를 사용하였을 때, 선택 이유에 대한 적정성

(4) 시험 동물

(가) 사용된 종/계통

(나) 동물의 수, 주령, 성별

(다) 사육조건, 시험을 시작할 때, 각 동물의 체중

(5) 시험 조건

- (가) 투여량 선택에 대한 이유
- (나) 시험 물질 배합/사료 제조에 대한 상세한 설명, 결정 농도, 배합과 제조의 안정성 및 균질성
- (다) 시험 물질 투여에 대한 상세한 설명
- (라) 사료/음수 시험 물질 농도(ppm)를 실제 투여량(mg/kg/day)으로 전환
- (마) 사료 및 음수관련 상세한 설명
- (6) 시험의 결과
 - (가) 체중, 사료 및 음수 섭취량
 - (나) 번식력, 수태, 기타 모든 독성 징후를 포함한 성 및 투여별 독성 반응 데이터
 - (다) 수태 기간
 - (라) 생식, 차산자, 출생 후 성장 등에 대한 독성 혹은 다른 영향
 - (마) 임상 관찰의 특성, 심각성, 기간
 - (바) 생존한 차산자 및 착상 후 죽은 태자 수
 - (사) 전체적인 이상을 가진 차산자 수, 작은 차산자 수
 - (아) 시험 기간 동안 시험동물이 폐사한 시기 혹은 생존한 동물의 부검시기
 - (자) 착상한 태자 수, 황체의 수(권장사항), 한배 새끼 크기 및 체중
 - (차) 부검 동물의 체중 및 수태한 동물의 장기 무게
 - (카) 부검 결과

(타) 수컷 생식 기관 및 다른 조직에 대한 현미경관찰 결과

(파) 결과에 대한 적절한 통계 방법

(하) 표의 생식/발생독성 스크리닝 시험 요약보고서

(거) 시험물질의 유해한 생식 및 발생 영향이 관찰되지 않는 최고농도 (NOAEL)

(7) 결과의 고찰 및 결론

(표) 생식/발생독성 스크리닝 시험 요약보고서

관찰	대조군	저농도군	중농도군	고농도군
Pairs started (N) 짝짓기 시작(N)				
Females showing evidence of copulation 교미 암컷(N)				
Females achieving pregnancy (N) 수태 암컷(N)				
Conceiving days 1 - 5 (N) 수태 1-5일(N)				
Conceiving days 6 - . . . ⁽¹⁾ (N) 수태 6일- . . . ⁽¹⁾ (N)				
Pregnancy ≤ 21 days (N) 수태 ≤ 21일(N)				
Pregnancy = 22 days (N) 수태 = 22일(N)				
Pregnancy ≥ 23 days (N) 수태 ≥ 23일(N)				
Dams with live young born (N) 건강하게 출산한 어미(N)				
Dams with live young at day 4 pp (N) 출산 후 4일(pp)이 된 어미(N)				
Corpora lutea/dam (mean) 황체/어미(평균)				
Implants/dam (mean) 착상/어미(평균)				
Live pups/dam at birth (mean) 생존한 차산자/출산한 어미(평균)				
Live pups/dam at day 4 (mean) 생존한 차산자/출산 4일 후 어미(평균)				
Sex ratio (m/f) at birth (mean) 출생한 차산자의 성 비율(수컷/암컷)(평균)				
Sex ratio (m/f) at day 4 (mean) 출생 4일 후 차산자의 성 비율(수컷/암컷)(평균)				
Litter weight at birth (mean) 출생한 한배 새끼의 평균체중				
Litter weight at day 4 (mean) 출생 4일 후 한배 새끼의 평균체중				
Pup weight at birth (mean) 출생한 차산자의 4일 후 평균체중				
Pup weight at day 4 (mean) 출생한 차산자의 평균체중				

⁽¹⁾ 교미 기간 마지막 날

KOSHA GUIDE
T - 6 - 2017

관찰	대조군	저농도군	중농도군	고농도군
ABNORMAL PUPS				
비정상적인 차산자				
Dams with 0 '0'인 어미				
Dams with 1 '1'인 어미				
Dams with ≥ 2 ' ≥ 2 '인 어미				
LOSS OF OFFSPRING				
죽은 차산자				
Pre-implantation (corpora lutea minus implantations)				
착상 전(황체 - 착상)				
Females with 0 '0'인 암컷				
Females with 1 '1'인 암컷				
Females with 2 '2'인 암컷				
Females with ≥ 3 ' ≥ 3 '인 암컷				
Pre-natal/post-implantations (implantations minus live births)				
출생 전/착상 후(착상 - 생존한 차산자)				
Females with 0 '0'인 암컷				
Females with 1 '1'인 암컷				
Females with 2 '2'인 암컷				
'Females with ≥ 3 ≥ 3 '인 암컷				
Post-natal (live births minus alive at post-natal day 4)				
출생 후(생존한 차산자 - 출생 4일 후 생존한 차산자)				
Females with 0 '0'인 암컷				
Females with 1 '1'인 암컷				
Females with 2 '2'인 암컷				
Females with ≥ 3 ' ≥ 3 '인 암컷				