

KOSHA GUIDE

T - 8 - 2021

화학물질의 시험관내 포유류 세포 유전자
돌연변이 시험지침

2021. 12.

한국산업안전보건공단

안전보건기술지침의 개요

- 작성자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 임 경 택
- 개정자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 임 경 택
- 개정자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 조 지 민

- 제정 경과
 - 2013년 11월 산업독성분야 제정위원회 심의
 - 2017년 9월 산업독성분야 제정위원회 심의(개정)
 - 2021년 11월 산업독성분야 제정위원회 심의(개정)

- 관련규격 및 자료
 - “*In vitro* Mammalian Cell Gene Mutation Test”, OECD Guideline for the testing of chemicals. TG476, Adopted 29 July 2016.

- 관련법규, 규칙, 고시 등
 - 산업안전보건법 제105조(유해인자의 유해성·위험성 평가 및 관리)
 - 산업안전보건법 시행규칙 제141조(유해인자 분류기준), 제143조(유해인자의 관리 등)
 - 국립환경과학원고시 제2020-46호(화학물질의 시험방법에 관한 규정)
 - 고용노동부고시 제2020-130호(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 : 2021년 12월

제 정 자 : 한국산업안전보건공단 이사

화학물질의 시험관내 포유류 세포 유전자 돌연변이 시험지침

1. 목적

이 지침은 『산업안전보건법』 제105조(유해인자의 유해성·위험성 평가 및 관리 등) 및 산업안전보건법 시행규칙 제141조(유해인자의 분류기준), 제143조(유해인자의 관리)에 의거하여 화학물질 유해성 평가를 위한 유전독성시험 중 포유류 세포의 히포크산틴-구아닌 포스포리보실기 전이효소(HPRT: hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase), 크산틴-구아닌 포스포리보실기 전이효소(XPRT: xanthine-guanine phosphoribosyl transferase) 유전자에 이상을 유발하는 화학물질을 시험관내(*in vitro*) 시험방법의 제안을 목적으로 한다.

2. 적용범위

이 지침은 『산업안전보건법』 제105조(유해인자의 유해성·위험성 평가 및 관리 등), 산업안전보건법 시행규칙 제141조(유해인자의 분류기준), 제143조(유해인자의 관리) 및 국립환경과학원고시 제2020-46호(화학물질의 시험방법에 관한 규정)에 의거하여 화학물질 유해성 평가를 위한 유전독성시험 중 포유류 세포의 유전자에 이상을 유발하는 화학물질을 시험관내(*in vitro*) 시험을 통해 확인하는데 적용한다.

3. 정의

(1) 이 지침에서 사용하는 용어의 뜻은 다음과 같다.

(가) “전향 돌연변이(Forward mutation)”란 야생형(wild type) 유전자에 변이를 일으켜 전사 단백질의 활성 또는 기능을 상실 또는 변화시키는 돌연변이를 말한다.

(나) “염기쌍 치환 돌연변이원(Base pair substitution mutagens)”이란 DNA에서 한 쌍 혹은 여러 염기쌍의 치환을 유발하는 물질을 말한다.

(다) “해독틀 돌연변이원(Frameshift mutagens)”이란 DNA 분자에서 단일 혹은 여러 염기쌍의 삽입이나 결실을 유발하는 물질을 말한다.

(라) “돌연변이 빈도(Mutant frequency)”란 측정된 돌연변이 세포 수를 살아 있는 세포 수로 나눈 것을 말한다.

(마) “상대적 총성장(Relative total growth)”이란 시험기간 동안 대조군과 비교해 처리군에서 나타난 세포수의 증가정도를 말한다.

(바) “생존성(Viability)”이란 발현 기간 후에 선택 조건에서 평판 배양(plating)하였을 때 처리된 세포의 복제 효율을 말한다.

(사) “상대 생존율(Relative survival)”이란 세포 독성의 척도로 사용되며, 음성 대조군(100%로 가정)에서의 복제 효율 대비 시험물질 처리군의 복제 효율을 말한다.

(아) “복제 효율(Cloning efficiency)”이란 셀 수 있는 정도까지 자란 저밀도로 깔려있는 세포의 백분율을 말한다.

(자) “세포 독성(Cytotoxicity)”이란 음성대조군과 비교하여 처리군의 상대적 생존율 감소로 확인되는 시험물질의 특성을 말한다.

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

4. 시험의 준비

4.1 시험의 준비

4.1.1 시험 세포

(1) 일반적으로 HPRT 시험에는 L5178Y, CHO, CHL, V79, TK6 세포주를 사용

하고, XPRT 시험에는 AS52 세포주를 사용한다. 단, 시험에 사용하는 세포는 화학적 돌연변이원에 민감성이 증명되어 있고, 높은 복제 효율 및 안정적인 자연적 돌연변이 빈도를 가지고 있어야 한다. 또한 세포는 마이코플라즈마(mycoplasma)에 오염되지 않았는지 확인해야 하며, 만일 오염되었다면 시험에 사용할 수 없다.

- (2) 시험에 사용하는 세포수는 해당 세포의 자연적 돌연변이 비율에 따라 적절하게 결정하지만, 보통 최소한 10^6 개 이상의 세포를 사용하는 것을 권장한다. 시험 세포의 생장시간, 자연 돌연변이율, 특성 등에 대한 데이터들은 본 시험에 유용한 근거를 제공할 수 있다.

4.1.2 배양액 및 배양 조건

시험 세포에 따라 적절한 배양액과 배양조건(배양용기, 온도, 이산화탄소 농도, 습도 등)을 제공한다. 배양액은 시험의 형태와 세포의 종류에 따라 선택적으로 사용한다. 배양조건은 세포의 생장률이 최적이 되도록 하며, 돌연변이 또는 비돌연변이 세포들이 콜로니를 형성하는데 알맞도록 정한다.

4.1.3 세포 접종

세포는 보관 세포주로부터 분리하여 배양액에 접종한 후 37°C에서 배양한다. 시험에 사용하기 전, 배양액 내에 돌연변이 세포들이 존재하지 않도록 제거한다.

4.1.4 대사활성계(Metabolic activation)

내인성 대사능력이 부족한 세포에는 외인성 대사활성계(S9 mix)를 사용한다. 가장 널리 사용되는 대사활성계는 아로클로르 1254(aroclor 1254) 또는 페노바비톤(phenobarbitone)과 베타-나프토플라본(β -naphthoflavone)의 혼합물과 같은 효소 유도물질을 처리한 설치류의 간으로부터 분리한 S9 분획물이다. S9 분획물은 일반적으로 최종 시험배양액의 1~2%(v/v)를 사용하고, 10%(v/v)까지 증가할 수 있다.

- (2) 대사활성계는 시험물질의 종류에 따라 적절하게 선정한다. 경우에 따라서는

1개 농도 이상의 분획물을 사용할 수 있다. 특정 효소가 활성화되는 유전자 변형 세포주 개발에 따른 다양한 대사활성계의 사용이 가능해졌으나 개발된 세포주를 사용할 경우에는 과학적 근거와 시험에 사용할 수 있는 타당성을 제시하여야 한다.

4.1.5 시험물질의 조제

고형의 시험물질은 용매 또는 매개물질에 용해시키거나 현탁하여 사용하며, 세포에 처리하기 전에 적절하게 희석한다. 액상의 시험물질은 직접 또는 희석하여 세포에 처리한다. 가스 혹은 증기 시험물질은 밀봉된 배양관 내에서 시험하는 것과 같이 적절하게 변형시킨 방법을 사용한다. 시험물질의 안정성 자료가 없는 경우에는 시험 직전에 시험물질을 조제한다.

4.1.6 시험조건

(1) 용매 또는 매개물질

용매 또는 매개물질은 시험물질과 반응하여서는 안 되며, 세포의 생장과 S9 분획물의 활성화에 영향을 주지 않아야 한다. 잘 알려진 용매나 매개물질 외에 다른 것을 사용할 경우, 이들 사용의 적합성을 증명할 수 있는 자료를 제시하여야 한다. 수용성 용매 또는 매개물질을 우선적으로 사용한다. 시험물질이 물에 불안정할 경우에는 물이 제거된 유기용제를 사용하도록 한다. 수용성 용매는 최종 시험 배양액의 10%(v/v)를 넘지 않아야 하고, 유기용매의 경우 1%(v/v)를 넘지 않아야 한다.

(2) 노출 농도

시험물질의 최고농도는 세포독성, 용해도, pH 및 삼투압의 변화 등을 고려하여 결정한다. 예비시험을 통해 시험물질의 세포독성 농도 및 용해도 등의 자료를 확보하는 것을 권장한다. 최소한 4개 이상의 처리군 농도를 설정한다. 처리군의 농도 범위는 세포의 치사독성부터 무독성까지 포함되도록 설정한다. 세포독성에 근거해 농도 범위를 설정할 경우, 최고농도는 약 10~20%의 상대적 생존율 (상대적 복제 효율) 또는 상대적 총생장을 나타내는 농도가 바람직하다. 세포독성이 거의 없는 시험물질의 경우에는 최고 농도가 2 mg/ml, 2 μ l/ml 또는 10 mM 가운데 낮은 쪽이 되도록 한다. 배양액에서의 시험물질 용해정도는 세포, S9 분획물 또는 혈청의 첨가 등에 따라 달라

질 수 있으므로 처리 개시시와 처리 종료시에 용해도를 평가한다. 난용성 물질은 침전물의 상태 등을 육안으로 관찰하며, 침전물은 계수를 방해하지 않아야 한다.

4.1.7 대조군

- (1) 매 시험마다 대사활성계의 존재 및 부재시 모두에 대해 양성 및 음성대조군 (용매 또는 매개물질)을 포함하여야 한다. 대사활성계를 사용할 경우 양성대조물질은 돌연변이 반응을 유발하기 위해 활성화를 요구하는 것이어야 한다. 대표적인 양성대조물질은 표 1과 같다. 표에 제시된 물질 외에도 경험적으로 축적된 자료가 있는 경우에는 다른 양성대조물질을 사용할 수 있다.

<표 1> 시험관내(In vitro) 포유류 세포 유전자 돌연변이시험에 사용되는 양성대조물질

대사활성 조건	위치	화학물질명 및 CAS 번호
외인성 대사활성계 부재시	HPRT	Ethylmethanesulfonate [CAS No. 62-50-0] Ethylnitrosourea [CAS No. 759-73-9] 4-Nitroquinoline 1-oxide [CAS No. 56-57-5]
"	XPRT	Streptonigrine [CAS No. 3930-19-6] Mytomycin [CAS No. 50-07-7]
외인성 대사활성계 존재시	HPRT	3-Methylcholanthrene [CAS No. 56-49-5] Benzo(a)pyrene [CAS No. 50-32-8] 7,12-Dimethylbenzanthracene [CAS No. 57-97-6]
"	XPRT	Benzo(a)pyrene [CAS No. 50-32-8]

- (2) 처리군과 동일한 방법으로 용매 또는 매개물질만을 처리한 음성대조군을 포함하도록 한다. 또한 선택된 용매 또는 매개물질의 돌연변이 유발 효과 등에 대해 경험적으로 축적된 자료가 존재하지 않는 경우에는 용매 또는 매개물질에 노출되지 않는 무처리군을 포함하도록 한다. 이때 사용하는 용매 또는 매개체의 돌연변이 발생률 등에 대한 자료가 존재하지 않는 경우, 용매 또는 매개체도 노출하지 않는 비노출군을 별도로 설정하도록 한다.

5. 시험방법

5.1 원리

포유류 배양세포를 시험물질에 노출시킨 다음 시험관내(*in vitro*) 시험조건에서 DNA 수준에서의 변화에 따른 돌연변이 여부를 측정한다. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase gene(HPRT) 효소 또는 Xanthine-guanine phosphoribosyl transferase gene(XPRT) 효소의 결핍 세포를 이용한 시험법으로 각각 HPRT 시험법과 XPRT 시험법으로 부른다. 이들 세포는 정상세포와 달리 세포독성을 가진 6-thioguanin(TG)을 유전자 합성에 사용하지 않으며 따라서 세포독성이 나타나지 않는다. 시험물질에 의해 위의 효소에 돌연변이가 나타날 경우에는 6-TG가 유전자 합성에 사용되어 세포독성이 나타나므로 배양세포의 성장 정도를 측정하여 돌연변이 빈도를 계산한다.

5.2 시험물질의 처리

5.2.1 배양세포는 대사활성계의 존재 및 부재시에 시험물질에 노출시킨다. 노출은 적절한 기간 동안 실시하는데 보통 3~6시간 노출한다. 시험의 모든 단계에서 배양 중에 자연적으로 유발되는 돌연변이가 10개 이내로 유지될 수 있도록 세포를 적절히 계대 혹은 처치한다. 일반적으로 돌연변이 빈도는 $5 \times 10^{-6} \sim 2.0 \times 10^{-7}$ 이다.

5.2.2 각 용량 당 2개 이상의 반복수를 두는 것을 권장한다. 만일 반복수를 두지 않을 경우에는 처리 농도군 수를 반복수를 두는 경우보다 증가시키도록 한다(예, 반복수를 두지 않을 경우에는 처리 농도군 수를 8개 이상 설정). 음성대조군은 2개 이상의 반복수를 두어야 한다.

5.2.3 기체 또는 휘발성 물질은 밀폐된 배양용기 사용과 같은 적절한 방법을 사용하여 휘발되지 않도록 한다.

5.3 상대 생존율, 복제 효율 및 돌연변이 빈도 측정

5.3.1 시험물질의 노출 종료시에 생존율 측정과 돌연변이 표현형의 발현을 위해 세포를 세척하고 배양한다. 상대적 복제 효율(상대 생존율) 또는 상대적 총생장의 확인에 의한 세포독성의 측정은 처리기간 후에 보통 시작된다.

5.3.2 시험물질의 처리 후, 돌연변이 표현형이 발현될 수 있도록 최소 7 ~ 9일간 배양한다. 그 동안, 세포는 규칙적으로 계대배양한다. 표현형 발현 후에는 6-TG를 첨가한 배지와 그렇지 않은 배지에 세포를 다시 분주하고 콜로니 성장에 필요한 7 ~ 12일 동안 배양한 후 돌연변이의 빈도와 복제 효율을 측정한다.

6. 시험결과 및 보고

6.1 결과의 처리

6.1.1 시험결과는 대조군 및 처리군에서의 세포독성, 상대 생존율 및 돌연변이 빈도를 포함해야 한다.

6.1.2 복제 효율 = 셀 수 있을 정도로 자란 세포 수 / 배양 접시에 분주한 세포 수

6.1.3 상대 생존율 = (시험물질 처리군의 보정된 복제 효율 / 음성 대조군의 보정된 복제 효율) × 100 %

6.1.4 돌연변이 빈도 = 관찰된 돌연변이 수 / 배양 접시에 분주한 세포 수

6.2 결과의 평가

6.2.1 어느 한 농도에서 음성대조군과 비교하여 유의적인 증가를 보이거나, 결과 값이 음성대조군의 범위를 넘으면 양성으로 판단한다. 음성대조군과 비교하여 어느 농도에서도 유의적인 증가가 나타나지 않고, 농도 의존적 증가가 없으며, 모든 결과 값이 음성대조군의 범위내에 있으면 음성으로 판단한다.

6.2.2 대부분의 시험에서는 시험물질이 유전자 돌연변이에 대해 양성 또는 음성을 나타내지만, 일부 물질의 경우 재시험을 반복하더라도 애매하거나 불분명한 결과를 나타낼 수 있다. 이때에는 적절한 사유와 타당성을 가지고 의양성으로 판정한다.

6.3 시험결과의 보고

결과보고서는 다음과 같은 정보를 포함하도록 한다.

6.3.1 시험기관의 명칭 및 소재지

6.3.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

6.3.3 시험물질

(1) 화학물질의 명칭(CAS 번호, 일반명, 상품명 명기)

(2) 입수처, 입수일

(3) 순도 또는 불순물

(4) 수용해도, 안정성 등 물리화학적 성질

6.3.4 용매 및 매개물질(vehicle)

(1) 용매 및 매개물질 선택에 대한 타당성

(2) 배양액 내 용매의 농도

6.3.5 세포

(1) 세포명, 형태 및 공급원

(2) 배양한 세포수

(3) 가능한 경우, 계대 횟수

(4) 핵형 특성 및 염색체의 수, 세포 배양 방법 및 세포 배가시간

(5) 마이크로플라스마의 부재 여부

6.3.6 시험조건

- (1) 시험농도, 배양 균주 수 등의 설정에 대한 근거
- (2) 배양액 조성 및 이산화탄소 농도, 습도
- (3) 시험물질 농도
- (4) 첨가한 용매 또는 매개물질의 부피, 시험물질의 부피
- (5) 배양 시간 및 온도
- (6) 시험물질의 노출기간
- (7) 노출기간의 세포 밀도
- (8) 대사활성계의 형태 및 구성
- (9) 양성대조군 및 음성대조군, 최종농도
- (10) 발현기간 (expression period)
- (11) 선택물질 (selective agents)과 농도
- (12) 시험물질을 양성, 음성 또는 의양성으로 판단하는 기준
- (13) 생존 세포 및 돌연변이 세포의 수를 계산하는데 사용된 방법, 세포독성 측정 방법 및 관련정보
- (14) 콜로니의 크기 및 형태를 판단하는 기준(예, 콜로니 크기를 ‘작다’ 및 ‘크다’로 분류한 기준)
- (15) pH, 삼투압 측정에 사용된 방법 및 침전상태

6.3.7 시험결과

- (1) 시험물질을 처리한 세포 수와 계대배양된 세포 수, 세포독성 측정 및 다른 관찰 결과
- (2) 침전물 상태
- (3) 시험물질에 노출되는 동안의 pH 및 삼투압(측정한 경우)
- (4) 배지 내의 세포 수, 콜로니 수
- (5) 돌연변이 콜로니를 결정짓는 판단기준에 대한 타당성 및 근거
- (6) 용량-반응 관계 (가능한 경우)
- (7) 통계적 분석 (통계 처리한 경우)
- (8) 음성대조군(용매 및 매개물질) 및 양성대조군에 대한 시험결과
- (9) 돌연변이 빈도

6.3.8 시험결과에 대한 고찰 및 결론

지침 개정 이력

□ 개정일 : 2021. 12.

- 개 정 자 : 산업안전보건연구원 조지민
- 개정 사유 : 법, 규정 개정에 따른 지침의 최신화
- 주요 개정내용
 - 산업안전보건법 개정에 따른 법 조항, 문구 수정
 - 고용노동부 고시 폐지에 따라 국립환경과학원고시 제2020-46호(화학물질의 시험방법에 관한 규정)에 따른 용어의 변경 및 내용 추가