

KOSHA GUIDE

H - 81 - 2021

## 화학물질의 유해성 평가를 위한 유전독성시험에 관한 기술지침

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
  - 2009년 10월 산업위생분야 제정위원회 심의(제정)
  - 2009년 11월 총괄제정위원회 심의
  - 2012년 5월 총괄제정위원회 심의(개정, 법규개정조항 반영)
  - 2015년 5월 산업독성분야 제정위원회 심의(개정, 법규개정조항 반영)
  - 2019년 11월 산업독성분야 기준제정위원회 심의(개정)
  - 2021년 09월 산업독성분야 기준제정위원회 심의(개정)
  
- 관련규격 및 자료
  - "Bacterial Reverse Mutation Test", OECD Guideline for the testing of chemicals. TG471, 21 Jul 1997
  - "In Vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test", OECD Guideline for the testing of chemicals. TG473, 29 Jul 2016
  - "Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test", OECD Guideline for the testing of chemicals. TG474, 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 유해성 평가를 위한 유전독성시험에 관한 기술지침(안)

## 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 취급 및 노출에 의한 독성 및 건강장해에 관한 정보를 제공하기 위한 산업화학물질의 유전독성 시험방법에 관한 지침을 정함을 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 화학물질의 노출에 의한 유전독성 영향 및 건강장해에 관한 독성시험에 적용한다.

## 3. 용어의 정의

(1) 이 지침에서 사용되는 용어의 정의는 다음과 같다.

(가) “화학물질의 유해성”이란 어떤 화학물질이 근로자에 노출되어 근로자의 건강에 악영향을 나타내는 그 화학물질의 성질을 말한다.

(나) “부형제(Vehicle)”란 시험대상 물질이 시험동물에 용이하게 투여되도록 시험물질을 혼합, 분산, 용해시키는데 이용되는 물질을 말한다.

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

- (라) “염색분체이상(Chromatid-type aberration)”이란 단일 염색분체가 절단 및 재결합됨으로써 나타나는 구조의 이상을 말한다.
- (마) “염색체이상(Chromosome-type aberration)”이란 두 염색분체가 동일한 위치에서 절단 및 재결합됨으로써 나타나는 구조의 이상을 말한다.
- (바) “중기 세포(Metaphase cell)”란 세포의 분열단계 중 중기(中期)에 해당하는 과정에 있는 상태의 세포를 말한다.
- (사) “유사분열지수(Mitotic index)”란 증식정도를 나타내는 지수로서 전체관찰 세포 중 중기 세포 비율을 말한다.
- (아) “개수의 이상(Numerical aberration)”이란 세포의 일반 염색체수와 다른 염색체수의 변화를 말한다.
- (자) “딸세포(Daughter cell)”란 한 개의 세포에서 분화되어 나온 새로운 세포를 말한다.
- (차) “딸염색체(Daughter chromosome)”란 한 세포가 가지고 있던 염색체가 분화된 딸세포를 위해 그 일부를 전해준 염색체를 말한다.
- (카) “동원체(Centromere, Kinetochore)”란 세포분열 시 염색체에 방추사가 붙어 나누어짐으로써 두 개의 딸세포로 이동할 수 있게 하는 염색체의 부위를 말한다.
- (타) “소핵(Micronucleus)”이란 세포의 주핵으로부터 분리된 작은 핵을 말하며, 세포분열 시 시험물질에 의하여 절단 및 탈락된 염색체의 단편이 딸세포로 전달되지 않고 남아 있는 것을 말한다.
- (파) “소핵시험(Micronucleus test)”이란 시험물질에 의해 소핵이 생성되는 정도를 관찰함으로써 시험물질의 유전독성을 평가하는 시험방법을 말한다.
- (하) “정염성 적혈구(Normochromatic erythrocyte)”란 성숙한적혈구로서 리보솜이 없으며, 미성숙한 다염성 적혈구와는 리보솜에 선택적인 염색으로 구분될 수 있는 것을 말한다.

- (거) “다염성 적혈구(Polychromatic erythrocyte)”란 미성숙한적혈구로 리보솜을 함유하고 있어, 성숙한 정염성 적혈구와 리보솜에 선택적인 염색으로 구분될 수 있는 것을 말한다.
- (너) “리보솜(Ribosome)”이란 단백질의 합성에 관여하는 세포내 소기관(Microorgan)을 말한다.
- (더) “복귀돌연변이성(Reverse mutation)”이란 생장에 필요한 아미노산의 하나인 히스티딘(Histidine)을 필요로 하는 박테리아가 히스티딘이 필요 없는 종으로 변화되는 유전자 변화를 말한다.
- (러) “아미노산 요구주”란 균주의 생장에 히스티딘(Histidine), 트립토판(Tryptophane) 등의 특정 아미노산(Amino acid)을 반드시 필요로 하는 균주를 말한다.
- (머) “복귀돌연변이시험(Reverse mutation test)”이란 살모넬라(Salmonella typhimurium)를 이용하여 아미노산 요구주에서 균주의 계통에 관계없이 외부의 아미노산의 공급에 따른 돌연변이를 검출하기 위한 시험을 말한다.
- (버) “염기쌍치환돌연변이원(Base pair substitution mutagens)”이란 유전자(DNA)의 염기 변화를 유발하는 물질을 말한다.
- (서) “갭(Gap)”이란 염색분체(Chromatid)의 폭보다 작고, 염색분체가 정열 되어 있지 않은 비(非)염색체성 병소(病巢, Achromatic lesion)를 말한다.
- (어) “대사활성화계(S9첨가법, 이하 ‘S9’이라 한다)”란 유전독성시험에서 미생물의 대사활성화를 위해 추가하는 설치류 간으로부터 얻어진 보조효소들의 집합체를 말한다.
- (저) “플레이트(Plate)”란 미생물을 접종하여 키우는 단위 시험재료로, 페트리디쉬(Petri-dish)라고도 한다.

(처) “진탕배양(Shaking incubation)”이란 미생물을 집종한 배양액을 흔들면서 배양하는 방법으로, 공기 중의 산소가 쉽게 배양액 속으로 스며들어 호기성(好氣性)균을 능률적으로 배양할 수 있는 방법을 말한다.

(커) “콜로니(Colony)”란 배지에서에서 균주들이 자라 덩어리 형태로 보이는 것을 말한다.

(터) “콜로니계수기(Colony counter)”란 콜로니의 개수를 자동적으로 세는 장치를 말한다.

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

#### 4. 유전독성시험의 종류 및 방법

화학물질의 유해성 평가를 위한 유전독성시험의 종류 및 방법은 다음과 같다.

##### 4.1 미생물을 이용한 복귀돌연변이시험

4.1.1 시험원리는 균주를 시험물질에 노출시키고 최소배지(Minimum nutrient)에 이식하고 배양한 후 형성된 콜로니수(Colony number)를 시험물질에 노출시키지 않은 대조군의 콜로니수와 비교하는 것이다.

4.1.2 살모넬라균은 TA1535, TA1537, TA98, TA100 종의 균주를 사용하여야 한다. 다만, 과학적 근거가 있을 때에는 다른 균주를 추가할 수 있다.

4.1.3 시험물질의 최고농도는 항균작용이 나타나는 농도로 하여, 최소한 5단계의 간격으로 용량군을 설정하여야 한다. 다만, 항균작용이 나타나지 않을 경우에는 5 mg/플레이트를 최고농도로 설정하여야 한다.

4.1.4 시험은 각 단계의 용량군에 대하여 2배 이상의 플레이트를 사용하여야 한다. 또한

4.1.4 S9을 첨가한 조건에서도 동일한 방법으로 시험을 실시하여야 한다.

4.1.5 음성대조군(Negative control)으로는 용매를 이용하고, 양성대조군(Positive control)으로는 이미 알려져 있는 변이원성 물질을 이용하여야 한다.

4.1.6 시험결과는 각 용량군별 형성된 콜로니수와 그 평균치 및 표준편차로 표시하여야 한다.

4.1.7 복귀돌연변이 콜로니의 수가 음성대조군에 비하여 2배 이상이고 투여용량에 비례하며, 그 작용에 재현성이 인정 가능한 경우 양성으로 판정하여야 한다.

4.1.8 미생물을 이용한 복귀돌연변이시험의 자세한 방법은 <부록1>을 참조한다.

#### 4.2 시험관내(In vitro) 포유류 염색체 이상시험

4.2.1 시험관내 염색체이상시험은 폐(Lung)나 난소(Ovary)와 같은 차이니즈 햄스터(Chinese Hamster)의 조직에서의 염색체 및 염색분체 이상을 관찰한다.

4.2.2 염색체 및 염색분체이상은 시험동물에서 암의 발생과 관련이 있다.

4.2.3 염색체이상시험에 사용하는 세포는 차이니즈 햄스터의 난소세포(Ovary cell)를 이용한다. 다만, 과학적 근거가 있을 때에는 다른 세포를 사용할 수 있다.

4.2.4 시험관내 포유류 염색체 이상시험의 자세한 방법은 <부록2>를 참조한다.

#### 4.3 설치류 조혈세포를 이용한 체내(In vivo) 소핵(Micronucleus)시험

4.3.1 설치류 조혈세포를 이용한 체내 소핵시험은 마우스(Mouse) 등의 시험동물을 이용하여 유전독성을 평가하며, 시험물질에 의해 유발되는 염색체이상을 관찰한다.

4.3.2 설치류 조혈세포를 이용한 체내 소핵시험은 시험동물의 골수 또는 말초혈액세포에서 채취된 적혈구를 분석한다.

4.3.3 유전독성을 갖는 시험물질에 의해 생성된 소핵은 염기성색소에 의하여 푸른색으로 염색된다.

4.3.4 설치류 조혈세포를 이용한 체내 소핵시험의 자세한 방법은 <부록3>을 참조한다.



## <부록 1> 미생물을 이용한 복귀돌연변이시험

### 1. 일반사항

#### 1.1 S9과 배지 등의 조제

1.1.1 S9 및 배지 등의 조제 시에는 멸균성을 유지하여야 한다.

#### 1.2 박테리아 균주의 품질관리

1.2.1 복귀돌연변이시험에 이용되는 살모넬라(Salmonella) 균은 시험물질에 대한 돌연변이 유발 감수성을 높이기 위하여 변이가 도입되어 유전적으로 불안정하므로 고형 플레이트에 보존하여서는 아니된다.

1.2.2 영구보존용의 균주는 고유의 유전형질을 확인하여 배양액에 동결보호제인 디메틸 소듐옥사이드(Dimethyl sodium oxide, DMSO)를 넣고 -80℃에 동결 보존하여야 한다.

### 2. 절차

#### 2.1 평판법

##### 2.1.1 세포독성시험

(1) 살모넬라(Salmonella) 균은 37℃에서 배양한다.

(2) 시험물질의 최고용량은 비독성 시험물질의 경우 5 mg/플레이트로 한다.

(3) 세포독성농도는 복귀돌연변이체의 수 감소, 기본 성장균 층의 무형성이나 감소를 나타내는 농도로 한다.

(4) 용량단계는 5단계 이상으로서 각 용량마다 1매의 플레이트를 사용하고, S9을 부여

- (4) 한 경우와 부여하지 않은 경우로 구분하여 시험하여야 한다.
- (5) 한천을 고압증기멸균(Autoclave)하고 약 50℃로 냉각시킨 후, 100 ml 한천에 대하여 5ml의 1.0 mM L-히스티딘/바이오틴을 가하여 45℃ 항온수조 내에서 보관한다.
- (6) S9을 조제하여 차갑게 보존한다.
- (7) 멸균시험관에는 균주 0.1 ml, 시험물질 0.1 ml, 인산완충액 0.5 ml을 넣고, 진탕기로 혼합하여 고형배지에 부어 한천이 고루 전개되도록 한다.
- (8) 한천이 굳은 후 평판을 뒤집어 37℃에서 48시간 배양한다.
- (9) 콜로니계수기(Colony counter)를 이용하거나, 육안으로 플레이트상의 콜로니를 직접 계수한다.
- (9) 독성이 나타나는 용량수준으로부터 전 배양시험에 적용할 용량단계를 설정한다.

## 2.2 본시험

### 2.2.1 최소한 아래 열거한 5개의 균주를 사용하여야 한다.

- (1) *Salmonella typhimurium* TA98
- (2) *Salmonella typhimurium* TA100
- (3) *Salmonella typhimurium* TA1535
- (4) *Salmonella typhimurium* TA1537 또는 TA97, TA97a 중 1개
- (5) *Salmonella typhimurium* TA102

### 2.2.2 한천을 고압증기멸균하고 약 50℃로 냉각시킨 후, 100 ml 한천에 대하여 5 ml의 1.0 mM L-히스티딘/바이오틴을 가하여 45℃ 항온수조 내에서 보관한다.

2.2.3 S9을 조제하여 차갑게 보존한다.

2.2.4 시험물질은 5단계로 희석하여 제조한다.

2.2.5 멸균시험관에 균주 0.1 ml 및 시험물질 0.1 ml, 인산완충액 0.5 ml를 넣고 진탕기로 혼합하여 고형배지에 부어 한천이 고루 전개되도록 한다.

2.2.6 한천이 굳은 후 평판을 뒤집어 37℃에서 48시간 배양한다. 모든 시험은 3매 이상의 플레이트를 사용하여야 한다.

2.2.7 콜로니계수기(Colony counter)를 이용하거나, 육안으로 플레이트상의 콜로니를 직접 계수한다.

2.2.8 결과의 판정은 S9 존재유무에 관계없이 최소 1개 균주에서 플레이트당 복귀된 콜로니 수가 1개 이상의 농도에서 재현성 있는 증가를 나타낼 때 양성으로 판정한다.

2.2.9 시험용 균주의 돌연변이 유발감수성과 S9의 활성을 확인하기 위하여, 각각에 대한 양성 대조군을 매 실험마다 설정하여야 하며, 음성대조군도 따로 설정하여야 한다.

2.2.10 전배양법

2.2.10.1 세포독성시험

(1) *S. typhimurium* 다섯 균주 모두를 사용하여 37℃에서 배양한다.

(2) 시험물질의 최고용량은 비독성 시험물질의 경우 5 mg/플레이트로 하고, 세포독성 시험물질은 복귀돌연변이체 수의 감소, 기본 성장균 층의 무형성 및 감소를 나타내는 세포독성 농도로 한다.

(3) 투여용량은 5단계 이상을 설정하며, 매 용량마다 1매의 플레이트를 사용하여, S9을 부여한 경우 및 부여하지 않은 경우 모두에 대하여 행하여야 한다.

(4) 한천을 고압증기멸균하고 약 50℃로 냉각시킨 후, 100 ml 한천에 대하여 5 ml의 1.0

- (4) mM L-히스티딘/바이오틴을 가하여 45℃ 항온수조 내에서 보관한다.
- (5) S9을 조제하여 차갑게 보존한다.
- (6) 멸균시험관에 균주 0.1ml 및 시험물질(최대 0.1 ml), 인산완충액 0.5 ml을 넣고, 37℃에서 30분간 진탕배양(Shaking incubation)한다.
- (7) 45℃ 한천 2 ml을 각각 분주하고, 잘 혼합하여 준비된 최소 글루코스 아가 (Minimum glucose agar) 배지에 부어 한천이 고루 펼쳐지도록 한다.
- (8) 한천이 굳은 후 평판을 뒤집어 37℃에서 48시간 배양한다.
- (9) 콜로니계수기를 이용하거나, 육안으로 플레이트상의 콜로니를 직접 계수한다.

#### 2.2.10.2 본시험

- (1) *S. typhimurium* 다섯 균주 모두를 사용하여 한다.
- (2) 용량단계는 5단계 이상을 설정하며, 매 용량마다 3매 이상의 플레이트를 사용하여, S9을 부여한 경우 및 부여하지 않은 경우의 양자에 대하여 행하여야 한다.
- (3) 한천을 고압증기멸균하고 약 50℃로 냉각시킨 후, 100 ml 한천에 대하여 5 ml의 1.0 mM L-히스티딘/바이오틴을 가하여 45℃ 항온수조 내에서 보관한다.
- (4) S9을 조제하여 차갑게 보존한다.
- (5) 멸균된 시험관에 균주 0.1 ml 및 시험물질, 인산완충액 0.5 ml을 넣고, 37℃에서 30분간 진탕배양한다.
- (6) 45℃ 한천 2ml을 각각 분주하고, 잘 혼합하여 준비된 최소 글루코스 아가(Minimum glucose agar) 배지에 부어 한천이 고루 펼쳐지도록 한다.
- (7) 한천이 굳은 후 평판을 뒤집어 37℃에서 48시간 배양한다.

(8) 콜로니계수기를 이용하거나, 육안으로 플레이트상의 콜로니를 직접 계수한다.

(9) 결과의 판정은 S9 존재유무에 관계없이 최소 1개 균주에서 플레이트당 복귀된 콜로니수에 있어서 1개 이상의 농도에서 재현성 있는 증가를 나타낼 때 양성으로 판정한다.

### 2.3 결과의 판정

2.3.1 적어도 2개 이상의 농도에 대해서 농도의존적인 증가와 음성대조군에 비해 2배 이상의 복귀돌연변이체가 관찰될 때 양성으로 판정한다.

2.3.2 단지 1개 농도에서만 음성대조군의 2배 이상의 복귀돌연변이체가 관찰될 때는 농도의존성과 관련하여 과학적인 근거가 있을 때만 양성으로 판단한다.

## <부록 2> 시험관내(In vitro) 포유류 염색체이상시험

### 1. 일반사항

#### 1.1 시험에 사용되는 배지 등의 제조

1.1.1 배지의 조제에서 제일 중요한 것은 배지의 무균 상태를 유지하는 것으로, 반드시 후드 내에서 수행해야 하고, 멸균검사를 위해 적어도 사용 3일전에 제조되어야 한다.

1.1.2 모든 배지 및 시약은 3차 증류수로 제조되어야 하며, 제조날짜가 적힌 표지를 부착하여야 한다.

### 2. 절차

2.1 CHL 세포의 경우, Eagle's MEM(Eagle's Salt, without Sodium bicarbonate) 1ℓ 용 1팩에 3차증류수를 가하여 전량을 950 ml가 되게 한다.

2.2 나트륨 바이카본산(Sodium bicarbonate) 2.2 g을 넣는다.

2.3 1N-염산으로 pH를 조정한 후 1ℓ로 맞춘다. (pH 7.1~7.2)

2.4 56℃에서 30분간 수욕(Water-bath) 상에서 가열하여 불활성화 시킨 소태자혈청알부민(Bovine serum albumin)을 10% 첨가한다.

2.5 세균여과지(통과경 0.22  $\mu$ m)가 부착된 필터로 세균여과하고, 4℃에 보관하여 사용한다.

2.6 오염 확인을 위하여 배지를 35 mm 플레이트에 2 ml씩 넣고 37℃, 5%의 이산화탄소가 공급되는 습윤한 배양기내에서 24시간 배양한 후 현미경으로 관찰하여 미생물의 오염여부를 확인하여야 한다.

2.7 세포배양에 사용되는 혈청은 받은 즉시  $-20^{\circ}\text{C}$  냉동상태로 신속히 보관하며, 멸균된 병에 분주하여 사용하고, 2회 이상 얼렸다 녹여서 사용하지 않아야 한다.

## 2.8 배양세포의 유지 및 관리

### 2.8.1 도입

- (1) 세포 배양물은 도입한 즉시 세포배양 기록부에 인수날짜, 출처, 세포계열, 성장배지 등을 기재한다.
- (2) 배양되는 모든 세포들은 적절한 배양배지와 배양조건들(배양용기,  $\text{CO}_2$ , 농도, 온도와 습도)이 사용되어야 하고 확립된 세포는 형태학적 염색체 수의 안정성과 마이코플라즈마(Mycoplasma) 비오염성에 대한 일상적인 검사가 있어야만 하고, 만약 오염되었다면 사용하지 말아야 한다.
- (3) 사용된 세포와 배양조건에 대한 정상적인 세포주기 시간이 알려져야 하고, 배양 중 형태 등의 이상유무를 매일 관찰하여야 한다.

### 2.8.2 배양세포의 유지

- (1) 차이니즈 햄스터(Chinese hamster) 유래의 세포들은  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%의 이산화탄소가 공급되는 습윤한 배양기내에서 단층(Monolayer)으로 자라며, 1회용 멸균  $25\text{ cm}^2$  배양플라스크에서 배양하여 3~5일 마다 계대한다.
- (2) 세포를 계대할 때에는 후드 내에서 실시하여야 한다.
- (3) 먼저 배지를 버리고 인산완충생리식염수(Phosphate buffered saline, PBS) 2 ml로 세척한다.
- (4) 0.25% 트립신-EDTA 용액 1 ml를 가하여 세포층 위에 잘 분산되게 한 다음 세포가 분리될 때 까지  $37^{\circ}\text{C}$  배양기에서 약 3~5분간 둔다.
- (5) 세포가 분리된 것을 현미경으로 관찰한 후, 배지 5ml를 첨가하여 파스퇴르 피펫으

(5) 로 잘 현탁하여 세포현탁액을 만든다.

(6) 세포 현탁액을 혈구판을 이용하여 세포를 계수한 후, 1ml 당  $2 \sim 6 \times 10^5$ 개의 세포를 새로운 배지가 담긴 배양 플라스크에 넣어 배양한다.

### 2.8.3 세포계의 관리

#### (1) 마이코플라즈마(Mycoplasma) 검사

(가) 단층 배양물은 마이코플라즈마 존재에 대해 2주마다 시험하여야 한다.

(나) 35 mm 플레이트에 1 ml 당 105개의 세포를 파종하고 3일간 배양한 후 시중에서 판매되고있는 마이코플라즈마(Mycoplasma) 검사용 시약에 의해 검사한다.

#### (2) 성장상태 검사

(가) 모든 세포계는 단층의 정상적인 성장을 관찰하기 위해 매일 현미경을 사용하여 관찰하여야 한다.

(나) 오염에 의한 미생물의 성장유무도 관찰하여야 한다.

#### (3) 세포의 냉동보존

(가) 세포현탁액을 만들어 실온에서 5분간 1,000 rpm으로 원심분리 한 후 상등액을 버리고, 15% 혈청을 함유하게 제조한 성장배지로 재현탁하여 세포의 밀도를 1 ml 당  $5 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$ 개가 되게 한다.

(나) 10%(v/v)농도의 차가운 DMSO를 소량씩 가하고 혼합한 다음 멸균된 세포보존용 튜브에 1 ml씩 분주한다. 바이알을 보관함에 넣고  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 2~3시간 보관한 후  $-80^{\circ}\text{C}$  냉동고에 하룻밤 방치하고 다음 날 액체질소탱크에 보관한다.

#### (4) 보존세포의 녹임



(가) 냉동된 세포를 37℃로 급속히 녹인다.

(나) 녹인 즉시 37℃로 가온한 10% 혈청 배지를 5 ml 첨가하여, 1,000 rpm에서 5분간 원심분리한다. 상등액을 버리고 5 ml의 새로운 배지로 잘 현탁하여 25 cm<sup>2</sup> 플라스크에 넣고 배양한다.

#### 2.8.4 혈구판을 이용한 세포수의 계수

- (1) 일정 부피내 배지중 들어있는 세포 수를 계수하여 배지와 희석비를 결정하는데 사용한다.
- (2) 세포현탁액을 만든다.
- (3) 멸균된 파스퇴르 피펫으로 세포현탁액 소량을 취하여 시험관에 넣고 동량의 0.75% 트리판블루(Trypan blue)를 가하여 잘 혼합한 다음, 미리 알코올 솜으로 깨끗이 닦은 혈구판의 양쪽으로 잘 스며들게 한다.
- (4) 위상차 현미경(Phase contrast microscope, Inverted microscope) 혈구판의 계수면을 네 곳으로 나누어 트리판블루(Trypan blue)에 염색되지 않은 살아있는 세포의 수를 좌측상단부터 센다. 이때 가장자리의 세포는 2/3가 안쪽으로 들어와 있는 것만 계수한다.
- (5) 일정부피의 배지 내에 함유된 세포의 수는 다음과 같이 계산하여 산출한다. 일정 세포현탁액 내의 생존세포 비율은 다음과 같이 계산한다.

a: Trypan blue에 염색된 세포의 수

b: Trypan blue에 염색되지 않은 세포의 수(생존세포)

#### 2.9 세포독성 시험

2.9.1 세포독성은 여러 가지의 원인으로 돌연변이, 변형, DNA 수복(Repair) 능력 상실과 같은 변수가 나타나므로 독성농도는 여러 요인들을 잘 고려해야 한다.

2.9.2 유전독성시험의 투여용량 결정을 위한 세포독성시험은 세포의 성장 저해를 일으키는 용량이 기준이 되며, 배양세포의 50% 증식억제 농도(ID<sub>50</sub>, 세포의 증식을 50% 억제하는 농도)를 구함을 목적으로 한다.

### 2.9.3 24 well 플레이트를 이용한 시험법

- (1) 고형의 시험물질은 적절한 용매에 녹이거나 현탁해야 하고, 필요한 경우 세포에 처리하기 전에 희석해야 한다.
- (2) 세포 계대시 1회용 24 well 플레이트에 1 well당 103개의 세포를 파종하여 배양한다.
  - (가) 2일간 24 well 플레이트에 배양된 세포에 시험물질 한 농도 당 4개의 well을 할당하여 처리한다.
  - (나) 최고농도는 비독성 시험물질은 5  $\mu\text{l}/\text{ml}$ 의 농도, 세포독성 시험물질은 집약적 세포 단층의 정도, 세포 수에서 50% 이상의 감소를 나타내는 농도로 한다.
- (3) 37°C에서 24시간 배양한다. 배양 후 배지를 버리고 미리 37°C로 가온한 인산완충생리식염수(Phosphate buffered saline) 0.5 ml로 2회 씻는다.
- (4) 각 well에 메탄올 0.5 ml를 넣어 10분간 고정시킨 후, 메탄올을 따라버리고 건조시킨다.
- (5) 5% 김자 염색액(Giemsa stain)으로 15분간 염색한다.
- (6) 현미경하에서 세포의 50% 증식억제농도(ID<sub>50</sub>, 세포의 증식을 50% 억제하는 농도)를 결정한다. 다만, 필요한 경우 육안으로 결정할 수 있다.
- (7) 630 nm에서 ELISA 판독기(Enzyme linked immunosorbent assay reader)로 각 well의 흡광도를 측정한다.

### 2.9.4 96 well 플레이트를 이용한 시험법

- (1) 고형의 시험물질은 적절한 용매에 녹이거나 현탁하여야 하고, 필요한 경우 세포에 처리하기 전에 희석해야한다.
- (2) 세포 계대 시 1회용 96 well 플레이트에 1 well당 106개의 세포를 파종하여 배양한다.
- (3) 1일간 96 well 플레이트에 배양된 세포에 시험물질 한 농도 당 8개의 well을 할당하여 처리한다.
- (4) 37℃에서 24시간 배양한다. 배양 후 배지를 버리고 미리 37℃로 가온한 인산완충 생리식염수 0.5 ml로 2회 씻는다.
- (5) 각 well에 새로운 배지 200  $\mu$ l + MTT 50  $\mu$ l를 첨가하여 각 well에 분주한다.
- (6) 플레이트를 3~4시간 정도 인큐베이션(Incubation) 한다.
- (7) 시험물질 220  $\mu$ l를 제거하고 보라색 물질 30  $\mu$ l만 남긴다.
- (8) 디메틸소듐옥사이드(Dimethyl sodium oxide, DMSO)를 150  $\mu$ l 첨가한다.
- (9) 10분간 vortexing한다.
- (10) ELISA reader로 540 nm에서 흡광도(OD값)를 측정한다.
- (11) 대조군에 대한 백분율을 자료로 사용한다.
- (12) PHARM(Pharmacological calculation program)의 Litchfield & Wilcoxon 시험을 이용하여 세포의 증식을 50%억제하는 농도인 ID50값을 구한다.

## 2.10 시험관내(in vitro) 염색체이상시험법

### 2.10.1 직접법

- (1) 세포 계대 시 직경 60 mm 일회용 멸균 페트리디쉬(Petridish)에 105개의 세포(배양액 5 ml)를 파종하고 3일간 배양한다.
- (2) 세포독성시험에서 얻은 약 50% 세포증식 억제농도(ID50)를 최고농도로 각 군당 농도의 비율을 2로 하는 3가지 농도로 시험물질을 조제, 희석하고, 무처리군, 음성대조군 및 양성대조군을 따로 설정하여 실험한다.
- (3) 시험물질군 및 각 대조군들은 한 농도당 각각 2개씩의 페트리디쉬를 사용하여 실험한다.
- (4) 양성대조군은 알려진 염색체이상 유발물질을 사용해야 하며, 일반적으로 마이토마이신 C(Mitomycin C) 0.05~0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 사용한다.
- (5) 시험물질을 녹인 용매별 플레이트에의 처리량은 다음과 같다.
  - (가) 멸균 생리식염수(수용성인 경우) 최종농도 10%
  - (나) 디엠에스오(DMSO) 최종농도 0.5%
  - (다) 에탄올 최종농도 1.0%
  - (라) 1% 카르복시셀룰로오즈 나트륨 최종농도 0.1%
- (6) 시험물질을 3~6시간 처리한 후, 다시 정상배지에서 배양하여 시험물질 처리 후 1.5 세포주기 경과 시기에 염색체표본을 제작한다.
- (7) 염색체 표본제작 2시간 전에 콜세미드(Colcemid, 최종농도 0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )를 처리한다.
- (8) 배양 종료 후 각 페트리디쉬의 배양액을 파스퇴르 피펫으로 미리 표시한 15 ml 시험관(원심관)에 옮긴다. 0.25% 트립신-EDTA용액 1 ml를 가하여 수 분간 방치한 다음 세포를 파스퇴르 피펫으로 잘 떨어뜨려 분산시키면서 수거하여 시험관에 합한다.

- (9) 수거한 세포현탁액을 약 1,500 rpm에서 5분간 원심분리하고, 상층액을 버린 후 미리 37℃로 가온한 0.075M 염화칼륨 용액 4 ml를 가하여 37℃ 항온수조에서 15분간 처리한다.
- (10) 처리 후 가볍게 교반하고, 0.5 ml의 냉각 고정액(메탄올:빙초산=3:1)으로 고정한다.
- (11) 1,500 rpm에서 5분간 다시 원심분리하고 상층액을 버린 후, 신선한 냉각 고정액 4 ml를 가하여 파스퇴르 피펫으로 잘 저어준다.
- (12) 50% 질산으로 세척한 냉장 보관된 청결한 슬라이드에 세포 부유액을 떨어뜨리고, 상온에서 건조시킨다.
- (13) 한 페트리디쉬(Petridish)당 양호한 슬라이드 2개씩을 완전히 건조시킨 다음, 5% 김자(Giemsa) 용액에 30분간 염색한다.
- (14) 흐르는 물로 세척하고 충분히 건조시켜 슬라이드 보관박스에 보관한다.

## 2.11 S9 첨가법

- 2.11.1 염색체이상시험 직접법과 동일하게 105개의 세포를 각 페트리디쉬에 배양하여 준비한다.
- 2.11.2 2일 후 각 페트리디쉬에서 배양액을 제거하고, 사용 직전 1 ml의 S9을 배지 4 ml에 혼합하여 시험물질과 함께 처리한다.

## 2.12 염색체이상의 계수 및 결과의 판정

- 2.12.1 각 페트리디쉬 당 200개의 세포분열 중기 세포에 대하여 현미경(1,000배)에서 염색체의 구조의 이상 및 개수의 이상을 가진 세포의 빈도를 구한다.
- 2.12.2 염색체 이상은 크게 구조의 이상(Structural aberration)과 개수의 이상으로 분류하고, 그것을 관찰하는 대상은 다음과 같다.

(1) 구조의 이상: Gap(염색분체형 ctg, 염색체형 csg 포함)

(2) 염색분체의 절단(ctb)

(3) 염색분체의 교환(cte)

(4) 염색체의 절단(csb)

(5) 염색체의 교환(dicentric, ring 등 ; cse)

(6) 개수의 이상: 배수체(polyploidy)

2.12.3 위의 염색체 이상을 1개 이상 가지는 세포를 양성으로 계수하고, 그 종류를 각각 기록한다.

2.12.4 결과의 판정은 염색체 이상을 가진 분열중기 세포의 수가 통계학적으로 유의성 있게 용량의존적으로 증가하거나, 하나 이상의 용량단계에서 재현성 있게 양성반응을 나타낼 경우를 양성으로 한다.

## <부록 3> 설치류 조혈세포를 이용한 체내(in vivo) 소핵시험

### 1. 일반사항

#### 1.1 시험동물종 선택

1.1.1 일반적으로 마우스(Mouse)나 랫트(Rat)가 권장되며, 말초혈액이 이용될 때에는 마우스가 권장된다.

1.1.2 소핵시험에 주로 사용하는 동물은 SPF(Specific Pathogen-Free, 특정 병원체 부재) 사육사에서 생산 공급되는 마우스 수컷이며, 성특이(Sex-linked) 물질 등의 경우 실험상 필요하다고 판단될 때에는 암수 양성의 동물 모두를 사용할 수 있다.

1.1.3 소핵시험에 사용하는 동물은 생후 8~12주령의 젊고 건강한 동물로, 체중 30~40 g 정도의 평균체중의 20%를 초과하지 않는 동물을 택한다.

1.1.4 한 군당 수컷 다섯 마리를 사용한다

### 2. 절차

#### 2.1 시험물질의 투여

2.1.1 시험물질의 조제는 포화용액을 만들며, 용매는 시험물질이 수용성일 경우는 생리식염수를, 지용성일 경우에는 올리브기름, 옥수수기름 등의 식물성 기름을 사용한다.

2.1.2 투여경로는 복강투여로 시험물질의 특성에 따라 선정하되, 예비시험에서 얻어진 결과와 동일하게 실시한다.

2.1.3 본시험에서의 용량단계는 3단계 이상으로 하며, 최고용량은 그보다 더 높은 처리용량에서 치사 등의 독성징후를 나타내는 용량으로 한다. 다만, 필요한 경우 전체 적혈구 가운데 미성숙 적혈구의 비율 감소를 나타내는 용량으로 할 수 있다.

2.1.4 독성징후가 인정되지 않는 경우에는 2 g/kg/day를 최고용량으로 한다.

2.1.5 투여회수는 1회 투여를 원칙으로 하며 필요에 따라 24시간 간격으로 2회 이상 연속 투여 한다. 표본 제작은 시험물질 투여 후 18~72시간에 행하는 방법이 일반적이다.

2.1.6 양성대조군과 음성대조군을 시험물질 처리군과 병행 실시한다. 대조군의 동물들은 시험물질 처리군의 동물들과 동등한 방식으로 다루어져야 하며, 음성대조군은 용매 대조로 한다.

2.1.7 양성대조물질로는 마이토마이신 C(Mitomycin C), 에틸메탄술폰산(Ethylmethanesulphonate), 에틸니트로소우레아(Ethylnitrosourea), 사이클로포스파미드(Cyclophosphamide), 트리에틸렌아민(Triethylenemelamine) 등과 같은 기지의 소핵유발 물질을 사용한다.

## 2.2 골수 채취 및 도말표본 제작법

2.2.1 골수 채취에 필요한 도구를 준비한다.

2.2.2 실험동물을 경추탈구를 이용하여 도살한다. 다만, 필요한 경우 에테르를 사용하여 도살할 수 있다. 에테르를 사용하여 도살할 때에는 환기장치가 잘 되어있는 장소에서 도살한다.

2.2.3 실험동물의 대퇴부를 알코올 솜으로 닦아낸 후, 해부가위와 핀셋을 이용하여 마우스의 무릎관절 부위 표피를 들어 절개한 후 양쪽의 대퇴골을 적출한다.

2.2.4 주사기에 소 태자 혈청(Bovine fetal serum, 약 0.5 ml/대퇴골)을 채워 골수세포를 세척하고, 마이크로튜브(Microtube)에 담는다.

2.2.5 1,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 적당량의 상등액을 파스퇴르 피펫으로 제거한다.

2.2.6 소량의 남은 혈청으로 파스퇴르 피펫을 사용하여 세포를 균일하게 현탁한 후, 청결한 슬라이드에 도말한다.



## 2.3 도말표본 염색법

2.3.1 도말 표본을 실온에 방치하여 충분히 건조시킨 후 메탄올(99% 이상)에 5분간 고정시킨다.

2.3.2 인산완충용액(Phosphate buffered saline, pH 6.8)으로 5%의 김자(Giemsa)액을 제조하여 실온에서 30분간 염색하거나 0.24 mM 아크리딘오렌지(Acridine orange) 용액을 제조하여 3분간 실온에서 염색한다.

2.3.3 Giemsa 염색 후에는 동일 완충액으로 1회 세척한 후, 0.004% 구연산용액에 수 초 동안 담가 정염성적혈구(NCE)와 다염성적혈구(PCE)와의 식별이 잘 되도록 하고 아크리딘오렌지 형광염색 후에는 동일 완충액으로 3회 각각 1~3분간 세척한다.

2.3.4 증류수로 1회 세척 후 실온에서 건조하고, 형광염색한 슬라이드는 파라핀 등으로 커버글라스(Cover glass)를 덮어 암소에 잘 보관한다.

## 2.4 판독 및 결과의 판정

2.4.1 판독은 현미경 1,000배의 배율에서 관찰한다.

2.4.2 Giemsa 염색에서 정염성적혈구(Normochromatic erythrocytes)는 연분홍색으로 관찰되며, 다염성적혈구(Polychromatic erythrocytes)는 연보라색으로 보인다.

2.4.3 소핵은 짙은 청색을 나타내며 염색으로 인한 검은 불규칙한 점과는 구별하여야 한다.

2.4.4 형광염색 시 다염성적혈구는 등적색의 형광을 나타내며 소핵은 황록색의 형광을 나타낸다.

2.4.5 개체 당 관찰세포 수는 2,000개이다. 먼저 1,000개의 세포 중 정상 적혈구에 대한 다염성적혈구의 비를 구하고 다음에 1,000개의 다염성적혈구 중의 소핵 출현율을 구하여야 한다.

2.4.6 결과의 판정은 소핵을 가진 다염성적혈구의 수가 통계학적으로 유의성 있게 투여 용량에 비례하여(Dose-dependent) 증가하거나, 하나 이상의 용량단계에서 재현성 있게 양성반응을 나타내는 경우를 양성으로 한다.

## 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, 고용노동부고시 제2020-57호) 폐지에 따른 국립환경과학원 고시(화학물질의 시험방법에 관한 규정) 인용