

KOSHA GUIDE

T - 16 - 2021

화학물질의 유전독성 평가를 위한  
단세포 겔 전기영동시험 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 산업독성분야 제정위원회 심의(제정)
  - 2019년 11월 산업독성분야 기준제정위원회 심의(개정)
  - 2021년 09월 산업독성분야 기준제정위원회 심의(개정)
  
- 관련규격 및 자료
  - “In vivo Mammalian Alkaline Comet Assay”, OECD Guideline for the testing of chemicals. TG489, 29 Jun 2016
  - “Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use”, ICH S2A and S2B Guidelines, June 2012
  - “Standard Guide for Determining DNA Single-Strand Damage in Eukaryotic Cells Using the Comet Assay“, ASTM Designation: E2186-02a
  
- 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 제 166호(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](http://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 00월 00일

제 정 자 : 한국산업안전보건공단 이사장

## 화학물질의 유전독성 평가를 위한 단세포 겔 전기영동시험 지침(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 유전독성 평가를 위해 수행하는 단세포 겔 전기영동시험 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 단세포 겔 전기영동시험 방법 및 결과의 작성에 적용한다.

### 3. 용어의 정의

(1) 이 지침에서 사용되는 용어의 정의는 다음과 같다.

(가) “단세포 겔 전기영동법(Alkaline single cell gel electrophoresis)”이란 개별 세포 또는 핵 수준에서 주요 DNA 손상을 민감하게 검출하는 기법을 말한다.

(나) “코멧(Comet)”이란 핵상 물질이 한 전기장에 놓였을 때 혜성과 유사한 모양이 생김으로 인한 개념으로, 머리 부분은 핵이고 꼬리 부분은 전기장에서 핵으로부터 이동된 DNA로 구성된 것을 말한다.

(다) “중요한 변수/매개 변수(A critical variable/parameter)”란 시험의 결과에 큰 영향을 미치는 시험방법의 작은 차이를 말한다. 중요한 변수들은 조직-특이적일 수 있다. 예를 들어 그 변화가 양성 및 음성대조군에서 가변성 및 크기와 같은 시험

- (다) 반응을 어떻게 변경시키는지에 대한 고려가 없이는 시험에서 중요한 변수들을 변경하지 않아야 한다.
- (라) “꼬리 강도(Tail intensity) 또는 꼬리 DNA의 백분율(% tail DNA)”란 전체 강도(머리와 꼬리)에 상대적인 코멧 코리의 강도를 말하며, 이것은 DNA 파손의 양을 반영하고 백분율로 표현한다.
- (마) “이수체 유발물질(Aneugen)”이란 유사분열이나 감수분열 시에 염색체수의 변화(Aneuploidy)를 유발하는 물질을 말한다.
- (바) “염색체이상 유발물질(Clastogen)”이란 염색체 파손의 원인이 되는 물질을 말한다.
- (사) “대조물질(Control material)”이란 시험물질과 비교할 목적으로 시험에 사용되는 물질을 말한다.
- (아) “매개물질(Vehicle)”이란 활성을 갖는 화학물질을 투여 시 용매로 사용되는 약효가 없는 물질을 말한다.
- (자) “EMS”란 Ethyl methanesulfonate(에틸 메탄술포산)으로서, 환경성 돌연변이원으로 사용되는 대표적인 화학물질을 말한다.
- (차) “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.
- (카) “3R 원칙”이란 동물실험의 윤리적 수행을 위한 기본 원칙으로서, 대체(Replacement : 세포 또는 조직배양, 수학적 모델로 동물실험을 대체), 감소(Reduction : 유용한 목적에 활용하고, 통계적으로 믿을 만한 자료를 산출할 수 있도록 최소한의 동물 수 사용), 개선(Refinement : 절차를 정교화하고 마취제 등을 사용함으로써 동물의 고통, 스트레스 등을 최소화해야 함)을 말한다.
- (타) “UVBCs”란 Unknown or Variable Composition, Complex reaction products and

(타) 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, 안전보건규칙, 고용노동부 예규 및 국립환경과학원 고시에서 정하는 바에 의한다.

## 4. 시험 개요

### 4.1 개요

4.1.1 생체 내 염기성 코멧(단세포 겔 전기영동) 시험(이하 “코멧 시험”이라 함)은 주로 잠재적 유전독성 물질에 노출된 설치류의 여러 조직으로부터 분리된 세포 또는 핵의 DNA 사슬 절단의 검출에 사용된다.

4.1.2 코멧 시험은 다양한 전문가 군에 의해 검토되고 권고되었으며, 이 시험 지침은 유전독성시험 지침 시리즈 중의 일부이다.

4.1.3 유전독성시험 지침의 개요로 제시되는 문서는 또한 이러한 시험지침들의 사용자에게 간결하고 유용한 지침을 제공할 수 있다.

4.1.4 코멧 시험의 목적은 DNA 손상의 원인 물질을 식별하는 것이다.

4.1.5 염기성 조건(>pH 13)에서 코멧 시험을 통해 DNA와의 직접 작용, 염기 불안정 부위 또는 DNA 절단 복구로 인한 일시적인 DNA 사슬 절단의 결과인 단일 및 이중 사슬 절단 등을 검출할 수 있다.

4.1.6 이런 사슬 절단은 영속적인 효과를 나타내지 않고 복구될 수 있기도 하지만 세포에 치명적, 영구적인 돌연변이로 고정될 수도 있다.

4.1.7 또한 암을 포함하는 사람에서의 많은 질병과 관련된 염색체 손상을 일으킬 수 있다.

4.1.8 생체 내 코멧 시험의 공식적인 검증 시험은 2006~2012년에 일본 대체시험법 검증 센터(JaCVAM), 유럽 대체시험법 검증 센터(EURL-ECVAM), 대체시험법의 검증에 대한 부처 간 조정위원회(ICCVAM)와 미국국립독성프로그램(NTP, National Toxicology Program) 부처 간 대체 독성시험법 평가 센터(NICEATM) 등에서 검증되었다.

4.1.9 이 시험 지침은 코멧 시험의 권장 사용 및 제한 사항을 포함하고, 확인 시험에 사용된 최종 프로토콜, 추가 발행 및 미발행(실험실 전용) 자료들을 기반으로 한다.

## 4.2 초기 고려사항 및 제한

4.2.1 코멧 시험은 진행 세포에서 DNA 사슬 절단의 측정을 위한 방법이다.

4.2.2 슬라이드의 아가로즈에 포함된 단일 세포/핵은 세제 및 고농도 염으로 용해한다.

4.2.3 이 용해단계는 세포 및 핵막을 분해하고 핵상물질(Nucleoid) 및 DNA 조각으로 불리는 꼬인 DNA 고리들을 방출하게 된다.

4.2.4 높은 pH에서 전기영동은 적절한 형광 얼룩을 사용하는 해성과 닮은 구조를 만들고 형광현미경으로 관찰할 수 있다.

4.2.5 DNA 조각들은 그 크기에 기초하여 “머리”로부터 “꼬리”로 이동하고, 총 강도(머리와 꼬리의 합)에 상대적인 코멧 꼬리의 강도는 DNA 절단의 양을 반영한다.

4.2.6 생체 내 염기성 코멧 시험은 특히 생체 내 ADME(흡수, 분포, 대사 및 배설) 및 DNA 복구 과정에 의존하는 이 시험의 반응에서 유전독성을 평가하는 것과 관련되며, 이것은 종 및 조직, DNA 손상의 유형에 따라 다양하다.

4.2.7 동물 복지를 충족하기 위해, 특히 동물 사용량(3Rs - Reduction, Refinement, Replacement - 원칙)에서 이 시험은 또한 반복 투여 독성시험 또는 생체 내 포유류 적혈구 소핵시험과 같은 기타 유전독성 결과와 통합될 수 있는 다른 독성시험과 결합할 수 있다.

- 4.2.8 이 코멧 시험은 다른 설치류와 비설치류 동물 중에 적용될 수 있지만, 설치류에서 가장 자주 수행된다.
- 4.2.9 비설치류종의 사용은 각 사례별로 과학적 및 윤리적으로 정당화되어야 하고 다른 독성연구의 일부 및 독립시험으로서가 아닌 종에서 수행할 것이 강하게 권장된다.
- 4.2.10 시험할 노출 경로 및 조직(들)의 선택은 예를 들어 사람 노출에서 의도된/예상된 경로, 대사 및 분포, 접촉부위의 잠재적 영향, 구조 경고, 기타 유전독성 또는 독성 자료 및 시험의 목적과 같은 시험 물질의 모든 사용가능한/존재하는 지식에 근거하여 결정되어야 한다.
- 4.2.11 따라서 적절한 경우, 시험물질의 잠재적 유전독성은 발암성 및/또는 기타 독성영향의 표적조직(들)에서 시험할 수 있다.
- 4.2.12 시험은 또한 시험관내에서 검출되는 유전독성의 추가 조사에 유용하게 고려된다.
- 4.2.13 관심 조직에 적절한 노출이 합리적으로 예상되는 경우 관심 조직에서의 생체 내 코멧 시험의 수행은 적절하다.
- 4.2.14 이 시험은 JaCVAM 시험 및 Rothfuss 등(2010)의 시험과 같은 공동 연구에서 수컷 랫드의 체세포 조직에서 가장 광범위하게 검증되었다.
- 4.2.15 간과 위는 JaCVAM 국제 검증시험에서 사용되었고, 간은 물질의 대사에서 가장 활동적인 기관이기 때문에 또한 발암성에서 표적장기로 자주 사용되었다.
- 4.2.16 위는 주로 경구 투여 후 물질의 첫 번째 접촉부위 이므로, 비록 십이지장과 공장 등의 다른 위장관 영역에서 또한 접촉조직으로 고려되어야 하고 설치류의 선위보다 더욱 적당하게 고려할 수 있다.
- 4.2.17 이런 조직이 높은 시험물질 농도에 과도하게 노출되지 않도록 주의해야 한다.
- 4.2.18 이 기술은 분석가능한 단일 세포/핵 현탁액이 유도될 수 있는 모든 조직에 적용되는 원리이다.

- 4.2.19 다른 많은 조직들에 대해서도 여러 연구실에서 성공적으로 수행되었으며, 특히 공장, 신장, 피부 또는 방광, 폐 및 기관지 폐포 세포(흡입 물질의 연구관련)와 같은 기관 또는 조직에 적용된 많은 연구 결과가 발표되었다.
- 4.2.20 생식세포에서 유전독성 영향에 대한 관심이 있을 수 있는 반면, 이 지침에 언급된 바와 같이 표준 염기성 코멧 시험은 성숙한 생식세포에서 DNA 사슬 절단의 측정 에 적절한 것으로 간주되지 않는 것을 언급해야 한다.
- 4.2.21 DNA 손상의 높고 다양한 배경 수준은 생식세포 유전독성을 위한 코멧 시험의 사용에 대한 문헌 고찰에서 보고되었고, 성숙한 생식세포(예, 정자)에서 코멧 시험 이전에 개선된 표준화 및 검증 연구와 함께 프로토콜 수정이 필요하며 시험 지침에 포함할 수 있다.
- 4.2.22 또한 이 지침에서 설명된 권장된 노출 계획은 최적이지 않고 더욱 긴 노출이나 시료채취 시간은 성숙한 정자에서 DNA 사슬 절단의 의미 있는 분석을 위해 필요할 것이며, 분화의 다양한 단계에서 고환 세포에서 코멧 시험으로 측정된 유전독성 영향은 문헌에 나와 있다.
- 4.2.23 하지만 생식선은 체세포와 생식 세포의 혼합물을 포함하는 것에 주의해야 한다.
- 4.2.24 이런 이유로 전체 생식선(정소)에서의 양성 결과는 생식세포 손상을 반드시 반영하지는 않지만, 그럼에도 불구하고 그것은 시험물질(들) 및/또는 그 대사물질이 생식선에 도달한 것을 의미한다.
- 4.2.25 가교는 코멧 시험의 표준 실험조건으로는 검출할 수 없다. 변경된 특정 실험 조건에서는 DNA-DNA 및 DNA-단백질 가교 및 산화된 염기와 같은 다른 염기 변화는 검출할 수 있다. 하지만 프로토콜의 수정에 필요한 적절히 특성화된 추가 작업이 필요할 것이다. 따라서 가교제의 검출은 여기에서 설명된 시험의 주요 목적이 아니다. 이 시험은 수정을 하더라도 이수체 유발물질(Aneugen)을 검출하는 데는 적절하지 않다.
- 4.2.26 현재의 기술 상태로는 코멧 시험과 관련된 몇 가지 추가적인 제한이 있다. 그 시험 지침은 향후 검토될 것이고 필요한 경우 경험에 따라 개정할 필요가 있다.



4.2.27 시험지침을 의도된 규정상의 목적으로 자료를 생산하기 위해 혼합물에 사용하기 전에 그 목적에 적합한 결과를 제공할 수 있는지, 그 이유에 대해 고려하여야 한다. 이런 고려는 혼합물의 시험에 대한 규제적 요구가 있을 때는 필요하지 않다.

#### 4.3 시험법의 원리

4.3.1 동물은 적절한 경로로 시험물질에 노출된다. 투여 및 시료채취의 자세한 설명은 5.4.3에서 5.4.6까지 서술하였다.

4.3.2 모든 선택된 시료채취 시간(들)에서, 관심 조직이 절개되고 단일 세포/핵 현탁액을 제조하며(예를 들어 간에서 유용하게 고려될 수 있는 원위치 관류가 수행될 수 있음)슬라이드에 고정하기 위해 소프트 아가에 포함한다.

4.3.3 세포/핵은 세포 및/또는 핵막을 제거하기 위해 용해 완충액으로 처리하고, 예로서  $\text{pH} \geq 13$ 의 강한 염기에 노출하여 DNA를 풀어 해체된 DNA 루프와 조각들을 배출하게 한다.

4.3.4 한천에서 핵 DNA는 전기영동 한다. 일반적인 조각나지 않은 DNA 분자들은 그 핵 DNA가 한천에 있던 위치에 남아있고, 반면 모든 조각난 DNA와 풀어진 DNA 루프들은 양극으로 움직일 것이다.

4.3.5 전기영동 후, DNA는 적절한 형광 염색을 이용하여 가시화되며, 그 준비는 현미경 및 완전 또는 반자동화된 이미지 분석시스템을 사용하여 분석하여야 한다.

4.3.6 DNA의 양은 전기영동 동안 이동하고 그 이동거리는 DNA 절단들의 양과 크기를 반영한다.

4.3.7 코멧 시험의 최종 결과는 다양한데 꼬리에서의 DNA양(꼬리DNA의 백분율 또는 꼬리강도의 백분율)은 DNA 손상을 평가하는데 권장된다.

4.3.8 충분한 수의 핵을 분석한 후, 그 자료들은 시험결과를 판정하는데 적당한 방법들로 분석한다.

4.3.9 방법론의 다양한 측면들을 변경하는 것은 주의해야 하고, 이것은 시료 준비, 전기 영동 조건, 시각적 분석 인자들(예, 염색 강도, 현미경 전구 광량 및 현미경 필터와 카메라 역학의 사용) 및 주변 조건들(예, 배경 조명)은 조사되고 DNA 이동에 영향을 미칠 수 있다.

#### 4.4 실험실 능력의 검증

4.4.1 각 실험실은 사용되는 각 종의 표적 조직(들)에 대해 충분한 품질의 단일 세포 또는 핵 현탁액을 획득할 수 있는 능력을 보여줌으로써 코멧 시험에서의 실험 역량을 확립해야 한다.

4.4.2 제제의 품질은 우선 낮은 재현 범위 내에 속하는 매개물질 처리 동물들의 꼬리 DNA의 백분율로 평가한다.

4.4.3 현재 자료들은 랫드의 간에서 그 군의 평균 꼬리DNA의 백분율(중간값의 평균에 기초 - 이 용어들의 자세한 내용은 6.1 참조)가 바람직하게는 6%를 초과하지 않아야 하고, 이는 JaCVAM 검증시험에서의 값들 및 기타 출판, 독점 자료들과 일치되어야 함을 의미한다.

4.4.4 이 경우에는 다른 조직에서 최적 또는 허용 범위에 대한 권장을 하기에 충분한 자료들이 없다. 이것은 정당화될 경우 다른 조직의 사용을 배제하지 않는다.

4.4.5 이 시험의 보고는 출판 논문 또는 독점 자료들과 관련된 이들 조직에서 코멧 시험 성능의 적절한 평가를 제공해야 한다.

4.4.6 우선 대조군에서 낮은 범위의 꼬리DNA의 백분율이 양성 효과를 검출하기에 충분한 동적 범위를 제공하는 것이 바람직하며, 각 실험실은 직접 돌연변이원 및 전돌연변이원에 대한 예상 반응을 표 1(5.3.1)에서 제안하는 것과 다른 작용 양식으로 재현할 수 있어야 한다.

4.4.7 예를 들어 JaCVAM 검증 시험 또는 기타 출판된 자료들 (4.2.14에서 4.2.19까지 참조)로부터, 적절한 경우 정당화를 통해, 그리고 관심 조직에서의 명확한 양성 반응을 보임으로써 양성 물질들을 선택할 수 있다.

- 4.4.8 알려진 변이원, 즉 낮은 용량의 EMS의 약한 효과를 감지하는 능력은 또한 예를 들어 적절한 수와 용량의 간격으로 양-반응 관계를 구축함으로써 나타내져야 한다
- 4.4.9 초기 노력은 예를 들어 설치류 간과 같은 가장 일반적으로 사용되는 조직들에서 능력을 구축하는데 초점을 맞춰야 하고, 기존 자료들 및 예상되는 결과들과 비교할 수 있다.
- 4.4.10 위/십이지장/소장, 혈액 등의 다른 조직들에서의 자료들은 동시에 수집할 수 있다.
- 4.4.11 실험실은 그들이 연구하고자 계획한 각 종에서 각 개별 조직의 능력을 보일 필요가 있고, 그 조직에서 얻어질 수 있는 알려진 변이원(예, EMS)에의 허용 가능한 양성 반응을 보일 필요가 있다.
- 4.4.12 매개물질/음성대조 자료들은 음성 자료 반응들의 재현성을 보이기 위해, 그리고 시험의 기술적 측면이 적절히 제어되었음을 증명하거나 표준 대조 범위(4.5.6에서 4.5.7까지)를 재확립할 필요성을 제안하기 위해 수집하여야 한다.
- 4.4.13 여러 조직들은 부검을 통해 수집할 수 있고 코멧 분석을 진행할 수 있는 반면 그 실험실은 단일 동물에서 다양한 조직들을 얻을 수 있는 능력이 필요함에 주목해야 하며, 따라서 모든 잠재적 DNA 병변이 손실되지 않고 코멧 분석이 절충되지 않았음을 증명해야 한다.
- 4.4.14 인도적 희생 처리를 위한 조직의 제거까지의 시간은 중요하다. (5.4.8 (다)에서 (바)까지)
- 4.4.15 동물 복지는 이 시험에서 능력을 개발하는 동안 고려하여야 하고 따라서 다른 시험에서 사용되는 동물들의 조직은 시험의 다양한 측면에서 능력을 개발할 때 사용할 수 있다.
- 4.4.16 더욱이 한 실험실에서 새로운 시험 지침 방법을 확립하는 단계 동안 전체 연구를 수행하는 것이 필요하지 않을 수 있고, 필요한 기술을 개발할 때 적은 수의 동물 또는 시험 농도를 사용할 수 있다.

#### 4.5 과거 대조군 자료(Historical Control Data)

4.5.1 실험 수행 연구실의 정도관리를 위해 일차적으로 실험실은 양성 및 음성대조 범위를 설정하기 위한 표준 데이터베이스 및 관련 조직과 종에서의 분포를 구축해야 한다.

4.5.2 과거 대조군 자료(즉, 표준 자료들에서 수용 및 제외의 기준과 주어진 실험에서 수용기준)을 어떻게 만들고 사용할 지에 대한 권고는 문헌에서 찾을 수 있다.

4.5.3 다른 조직과 종들 및 다른 매개물질과 투여 경로들은 서로 다른 음성대조 꼬리 DNA의 백분율값을 제공할 수 있다. 따라서 각 조직 및 종들의 음성대조 범위를 설정하는 것이 중요하다.

4.5.4 실험실들은 얼마나 다양한 자료들이 있는지, 그 방법론이 각 실험실에서 “통제중”이라는 것을 보이기 위해 제어 차트(예, C-차트 또는 X-막대 차트)와 같은 품질관리 방법을 사용해야 한다.

4.5.5 적절한 양성대조물질들, 용량 범위 및 실험조건들(예, 전기영동 조건들)의 선택은 또한 약한 영향(4.4.7에서 4.4.11까지)의 검출을 위해 최적화할 필요가 있다.

4.5.6 실험 프로토콜에서의 어떤 변화들은 그 실험실의 기존 표준 대조 데이터베이스들과 일관성의 측면에서 고려하여야 한다.

4.5.7 과거 대조군 자료에 이상이 있다면 새로운 과거 대조군 자료의 구축으로 이어져야 한다.

### 5. 시험 방법

#### 5.1 준비

##### 5.1.1 동물 종의 선택

- (가) 건강한 젊은 성체 설치류들(처리 시작 시 6~10주령이지만 약간 늙은 동물들도 또한 허용됨)을 일반적으로 사용한다.
- (나) 설치류 종의 선택은 다른 독성 연구(자료들을 상관시키고 통합 연구들을 허용할 수 있도록)에서 사용되는 종, 발암성 연구에서 종양을 생성하는 종(발암 기전을 조사할 때), 또는 알려진 경우 사람과 가장 적절한 대사를 갖는 종에 근거해야 한다.
- (다) 랫드는 이 시험에서 일반적으로 사용된다. 하지만 다른 종들은 윤리적 및 과학적으로 타당하면 사용할 수 있다.

#### 5.1.2 동물 사육 및 식이조건들

- (가) 설치류에서는 실험동물실의 온도는 이상적으로  $22^{\circ}\text{C}(\pm 3^{\circ}\text{C})$ 이어야 한다.
- (나) 상대습도는 50~60%를, 동물실 청소 시 이외에는 적어도 30% 이상 70%를 넘지 않도록 하는 것이 바람직하다.
- (다) 조명은 인공적으로 연속 12시간은 밝고, 12시간은 어둡게 해야 한다.
- (라) 먹이는 무제한 식수의 공급과 더불어 종래의 실험식이를 사용할 수 있다.
- (마) 식이의 선택은 이 경로로 투여될 때 시험물질의 적절한 혼합을 보장할 필요에 의해 영향을 받을 수 있다.
- (바) 공격적인 행동이 예상되지 않으면 같은 성별의 작은 군(주로 다섯 마리 이하)으로 사육해야 한다.
- (사) 동물들은 과학적으로 정당화된 경우에만 개별적으로 수용할 수 있다.
- (아) 고체 바닥은 그물 바닥이 심각한 부상을 유발할 수 있을 때 가급적 사용하여야 한다.
- (자) 적절한 풍요한 환경을 제공하여야 한다.

### 5.1.3 동물의 준비

(가) 동물은 대조 및 처리군으로 임의 할당하여야 한다.

(나) 동물들은 특이적으로 식별될 수 있도록 하고, 적어도 처리 시작의 5일 전에 실험실 조건들에 적응되어야 한다.

(다) 동물의 고유한 식별은 최소 침습적 방법을 사용하여야 한다.

(라) 적절한 방법으로는 울림, 꼬리표, 마이크로칩 및 생체인식을 포함한다.

(마) 발가락과 귀의 클리핑은 이 시험에서 과학적으로 정당화되지 않았다.

(바) 케이지는 배치로 인한 효과를 최소화하는 방법으로 배치하여야 한다.

(사) 연구의 시작 시에 동물의 체중 변화는 최소화해야 하고  $\pm 20\%$ 를 초과하지 않아야 한다.

### 5.1.4 용량의 준비

(가) 고체상 시험물질들은 동물들에 투여하기 전에 녹이거나 적절한 매개물질에 현탁하거나 먹이 또는 음용수에 혼합하여야 한다.

(나) 액체상 물질들은 투여에 앞서 직접 투여 또는 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

### 5.2.1 매개물질

- (가) 매개물질은 사용되는 용량 부피에서 독성 영향을 일으키지 않아야 하며, 시험물질과의 화학반응이 의심되지 않아야 한다.
- (나) 잘 알려진 매개물질이 사용되지 않는 경우 그 포함은 시험동물, 투여경로 및 종점의 측면에서 호환성을 나타내는 참고자료들이 지원되어야 한다.
- (다) 가능한 수용성 용매/매개물질의 사용이 가장 우선적으로 고려되어야 함이 권고된다.
- (라) 일부 매개물질(특히 점착성 매개물질들)은 특히 다중투여를 통해 염증을 유발하고 접촉 부위에서 DNA 사슬 절단의 배경수준을 증가시킬 수 있음에 주의해야 한다.

## 5.3 대조군

### 5.3.1 양성대조군

- (가) 이 시점에서 분석 가능한 최소한 한 가지 성별의 3마리 동물군 또는 두 가지 성별을 모두 사용하는 경우(5.4.1 (마)에서 (사)까지) 각 성별에서 양성대조물질 처리는 일반적으로 각 시험에 포함하여야 한다.
- (나) 향후 이는 양성대조의 필요성을 줄이기 위해 적절한 능력을 보이는 것이 가능할 것이다.
- (다) 여러번 시료채취를 하는 경우(예, 단일 투여 프로토콜) 시료채취 시간 중 하나에서 양성대조를 포함하는 것만 필요하지만, 균형 잡힌 설계(5.4.11 (가)에서 (타)까지 참조)를 확보해야 한다.
- (라) 접촉부위 효과를 측정할 때는 반드시 동일 경로를 사용하는 것이 중요하지만, 시험물질과 같은 경로를 통해 동시에 양성대조물질을 투여하는 것은 필요하지 않다.

- (마) 양성대조물질은 시험물질에 대한 모든 관심조직에서 DNA 사슬 절단을 유도하는 것을 보여야 하며, EMS는 시험된 모든 조직에서 DNA 사슬 절단을 생성했기 때문에 양성대조로 선택될 가능성이 높다.
- (바) 양성대조물질의 용량은 시험의 성능과 감도를 비판적으로 평가하는 적당한 효과를 내기 위해 선택하여야 하고, 숙련도 시험 중에 실험실에서 설정한 용량-반응 곡선에 기초할 수 있다.
- (사) 동시 양성대조 동물들에서 꼬리DNA의 백분율은 각 조직에서의 기설정 실험실 범위 및 각 종들의 시료채취 시간과 일치해야 한다(4.4.1에서 4.4.6까지 참조).
- (아) 양성대조물질의 예와, (설치류에서) 표적 조직 일부의 예를 <표 1>에 나타냈다.
- (자) 표 1에 나타낸 것 이외의 물질들은 과학적으로 정당화된 경우 선택할 수 있다

<표 1> 양성대조물질 및 표적 조직 일부의 예

물질명 (CAS 번호)	표적 조직
Ethyl methanesulphonate (CAS 번호 62-50-0)	모든 조직
Ethyl nitrosourea (CAS 번호 759-73-9)	간, 위, 십이지장 또는 공장
Methyl methanesulphonate (CAS 번호 66-27-3)	간, 위, 십이지장 또는 공장, 폐, 기관지세척(BAL) 세포, 신장, 방광, 폐, 고환 및 골수/혈액
N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (CAS 번호 70-25-7)	위, 십이지장 또는 공장
1,2-Dimethylhydrazine 2HCl (CAS 번호 306-37-6)	간, 장
N-methyl-N-nitrosourea (CAS 번호 684-93-5)	간, 골수, 혈액, 신장, 위, 십이지장, 공장 및 뇌



### 5.3.2 음성대조군

- (가) 매개물질 단독 처리한 음성대조 동물군 및 처리군과 같은 방법으로 처리한 다른 군들은 매 시료채취 시간과 조직에 대한 각 시험에 포함하여야 한다.
- (나) 음성대조 동물들에서 꼬리DNA의 백분율은 각 개별 조직의 기설정 실험실 범위 및 각 종들의 시료채취 시간 범위 내에 있어야 한다(4.4.1에서 4.4.6까지 참조).
- (다) 표준 또는 출간된 대조 자료들이 없는 경우는 선택된 매개물질, 투여 횟수, 투여 경로에 의해 유도된 악영향이나 유전독성 영향이 없음을 나타내야 하며, 초기 시험은 매개물질 대조의 수용성을 확립하기 위해 전체 시험을 수행하기에 앞서 수행하여야 한다.

## 5.4 절차

### 5.4.1 동물의 수와 성별

- (가) 비록 코멧 시험과 관련된 성별 간에 비교할 수 있는 암컷 동물들에 대한 자료가 거의 없지만, 일반적으로 다른 생체 내 유전독성 반응은 수컷과 암컷 동물들 간에 유사하므로 대부분의 시험들은 두 성별에서 수행할 수 있다.
- (나) 수컷과 암컷들 간의 상당한 차이를 보이는 자료들은(예를 들어 범위-설정 연구를 포함하는 전신 독성, 대사, 생체이용률 등의 차이) 두 가지 성 모두의 사용을 권장한다.
- (다) 이 경우 반복투여 독성시험의 일부로서 두 가지 성별에서의 시험을 수행함이 적절할 수 있다.
- (라) 두 성별에서 요인 설계의 사용이 적절할 수 있으며, 이 설계를 사용한 자료의 분석에 대한 자세한 내용은 부록 2에 제시하였다.
- (마) 시험 개시 시에 군의 크기는 한 가지 성별의 최소 5마리의 분석 가능한 동물들을, 두 가지 성별을 모두 사용하는 경우 군당(동시 양성대조군에서는 5마리 미만

(마) - 5.3.1 참조)을 제공하도록 설정하여야 한다.

(바) 화학물질에 사람이 노출되는 경우 성별-특이적일 수 있고, 예를 들어 일부 의약품의 경우, 그 시험은 적절한 성별로 수행하여야 한다.

(사) 최대 전형적 동물 요구사항에서와 같이, 시험은 5.4.2 (가)에서 (사)까지의 세 가지 농도 군으로 설정한 변수들에 따라 수행하고, 동시 음성 및 양성대조들 (각 군은 한 성별의 다섯 마리 동물로 구성됨)은 25에서 35마리 사이가 필요할 것이다.

#### 5.4.2 투여 일정

(가) 동물은 2일 이상(즉, 대략 24시간 간격으로 두 번 이상의 투여)의 기간 동안 매일 투여하여야 하고, 시료는 마지막 투여 후 2~6시간(또는 Tmax)에 한번 수집하여야 한다.

(나) 확장된 용량 요법 (예를 들어 28일간 매일 투여)에서의 시료는 허용가능하다.

(다) 코멧과 적혈구 소핵시험의 성공적인 조합은 증명되었지만 다른 유형의 독성학적 평가를 위한 조직 시료채취의 요구와 함께 코멧 분석의 조직 시료채취와 관련된 계획에는 주의를 기울여야 한다.

(라) 마지막 투여 24시간 후의 채취(Harvest)는 일반독성 시험에서 전형적이고 대부분의 경우(시료채취 시간은 5.4.5 참조)는 적절하지 않다.

(마) 다른 투여 및 시료채취 스케줄의 사용은 정당화되어야 한다(부록 2 참조).

(바) 예를 들어 복수의 시료채취에서 단일 투여는 사용될 수 있지만, 복수의 시료채취 시간이 필요하므로 단일 투여 시험에서 더 많은 동물들이 요구됨에 주목해야 하며, 예를 들어 시험물질이 반복투여에 따른 과도한 독성을 유도하는 때는 바람직할 수 있다.

(사) 시험이 수행되는 어떤 방법으로도 그 시험물질이 양성 반응을 나타내거나 음성 시험에서 노출의 직간접적 증거 또는 표적 조직에서 독성이 있음이 나타나거나 그 제한용량이 달성되면 받아들여질 수 있다(5.4.3 (바) 참조).

(아) 시험물질들은 또한 분할투여 즉, 대량 투여를 용이하게 하기 위해 같은 날에 적어도 2~3시간 이상 분리하여 두 번 투여할 수 있다.

(자) 이런 상황에서 시료채취 시간은 마지막 투여 시간에 기초하여 결정하여야 한다 (5.4.5 참조).

#### 5.4.3 용량 수준

(가) 투여량의 선택을 돕기 위해 다른 중요한 연구로부터 얻을 수 있는 적절한 자료들이 없으므로 예비 범위-설정 시험을 수행했다면, 용량 범위-설정 연구들의 수행을 위한 현재의 접근에 따라 본시험에서 사용된 같은 종, 계통, 성별 및 투여 방법을 사용한 같은 실험실에서 수행하여야 한다.

(나) 연구는 최대 허용 용량(MTD)을 결정하는 것을 목표로 하며, 사망, 통증의 증거, 인도적 희생을 필요로 하는 고통이 아니라, 시험기간에 비교한 약간의 독성 유도 용량으로(예를 들어, 비정상적 행동이나 반응, 약간의 체중 감소 또는 표적 조직 세포독성과 같은 명백한 임상적 증상들) 정의된다.

(다) 비독성 시험물질인 경우, 14일 이상의 투여기간에서 최대(제한) 용량은 매일 체중 kg 당 1,000 mg이다.

(라) 14일 미만의 투여 기간에서는 최대(제한)용량은 매일 체중 kg 당 2,000 mg 이다.

(마) 특정 형태의 시험물질들(예, 사람 의약품들)은 다양한 제한들이 있는 특정 규정을 적용한다.

(바) 독성동태학적 특성의 포화를 나타내는 물질들 또는 장기간 투여 후에 노출의 감소를 유도할 수 있는 해독과정을 유도하는 물질들은 용량-설정 기준에 예외일 수 없고 사안에 따라 평가하여야 한다.

(사) 코멧 시험의 급성 및 아급성 응용으로는 최대 용량(MTD, 최대 가능 용량, 최대 노출 또는 제한 용량)과 더불어 적어도 두 개의 추가 적절한 간격 용량 수준(가 급적  $\sqrt{10}$  미만으로 구분된)의 용량-관련 반응을 보이는 각 시료채취 시간으로 선택해야 하지만, 용량 수준은 또한 최대에서 약간의 독성 또는 전혀 독성을 나타내지 않는 범위까지를 포함해야만 한다.

(아) 표적장기 독성이 모든 시험 용량 수준에서 관찰될 때는 비독성 용량에서의 추가 시험이 바람직하다(5.4.13 (가)에서 (아)까지 참조).

(자) 용량-반응 곡선의 모양을 더욱 완전히 조사하기 위한 시험들은 추가 용량군(들)을 요구할 수 있다.

#### 5.4.4 용량의 투여

(가) 사람의 노출에서 예상되는 경로는 시험을 설계할 때 고려하여야 하므로 식이, 식수, 국소, 피하, 정맥, 경구(위관), 흡입, 기관 내 또는 주입과 같은 노출경로는 정당화를 통해 선택할 수 있다.

(다) 임의의 경우 그 경로는 표적조직의 적절한 노출을 보장하기 위해 선택하여야 한다.

(라) 복강 투여는 사람 노출의 전형적인 관련 경로가 아니어서 일반적으로 권장되지 않고, 특정한 정당성(예, 조사목적의 일부 양성대조물질 또는 복강 내 경로로 투여된 일부 약물)을 가져야지만 사용할 수 있다.

(마) 한 번에 위관 또는 주사에 의해 투여될 수 있는 액체의 최대 부피는 시험동물의 크기에 따라 다르다.

(바) 그 부피는 100 g 체중당 2 mg이 사용될 수 있는 수용액의 경우를 제외하고는 100 g 체중당 1 mg을 초과하지 않아야 한다.

(사) 이를 초과하는 부피의 사용은(동물복지 법률에 의해 허용된 경우) 정당화하여야 한다.

- (아) 모든 용량 수준에서 체중과 관련된 일정한 부피를 유지하기 위해 투여 제제의 농도를 조절함으로써 언제든지 서로 다른 용량 수준을 달성하여야 한다.

#### 5.4.5 시료채취 시간

- (가) 시료채취 시간은 표적 조직에서 시험물질이 최대 농도에 이르러 DNA 사슬 절단을 유도하는 데 필요한 기간으로 결정되지만 이 절단 이전에 제거, 복구 또는 세포사멸로 이어진다.
- (나) 코멧 시험으로 검출되는 DNA 사슬 절단을 유도하는 일부 병변의 지속성은 매우 짧을 수 있어서 적어도 일부 물질에서는 시험관내(in vitro)로 시험한다.
- (다) 따라서 이러한 과도한 DNA 병변이 의심되면 조직을 충분히 일찍, 아래의 기본시간보다 가능한 일찍 시료채취 함으로써 그 손실을 완화하기 위해 조치를 취해야 한다.
- (라) 최적의 시료채취 시간은 정맥 내 투여 또는 흡입노출에 의한 빠른 조직 노출과 같은 물질 또는 경로-특이적 결과를 가져올 수 있으므로 가능한 경우 시료채취 시간은 동태학적 자료들(예, 혈장 또는 조직의 최고 농도(Cmax)에 이르는 시간 또는 다중 투여 시 정상상태로 되는 시간(Tmax))에 시료채취 하며, 유전독성의 측정을 위해 적절히 타협할 수 있는 동태학적 자료들이 없는 경우는, 모든 동물들이 마지막(또는 유일한) 투여 후 같은 시간에 부검하는 것에 주의해야 하지만, 동시에 둘 이상의 투여 시 마지막 투여 후 2~6시간에, 단일 투여 후 2~6시간 및 16~26시간에 시료채취 한다.
- (마) 표적 기관(가능한 경우)에서 독성 영향에 대한 정보는 또한 적절한 시료채취 시간을 선택하는데 사용할 수 있다.

#### 5.4.6 관찰

- (가) 동물들의 건강에 관련된 일반 임상관찰은 적어도 하루 한 번 이상 측정 및 기록하여야 하고, 매일 같은 시간이 바람직하며, 투여 이후 기대되는 영향의 최고 기간을 고려해야 한다.

- (나) 적어도 하루에 두 번 모든 동물들은 이환율과 사망률을 관찰해야 한다.
- (다) 긴 기간의 연구인 경우 모든 동물들은 적어도 1주에 한 번 및 시험기간의 종료 시에 칭량해야 한다.
- (라) 사료소비량은 식이가 바뀌었을 때를 포함하여 최소 주 1회 측정되어야 한다.
- (마) 시험물질이 음용수를 통해 투여되는 경우 음용수 소비량은 음용수를 갈아줄 때를 포함하여 최소 주 1회 측정되어야 한다.
- (바) 과도한 비치사적 독성 지표들을 나타내는 동물은 시험 이전에 인도적 희생이 되어야 하고 일반적으로 코멧 시험에 사용하지 않는다.

#### 5.4.7 조직 수거

- (가) 거의 모든 조직에서 DNA 사슬 절단(코멧)의 유도를 시험할 수 있으므로, 수집된 조직 선택의 이론적 근거는 명확히 정의되고 기존의 모든 ADME, 유전독성, 발암성 또는 기타 연구 중인 시험물질의 독성 자료들과 함께 시험 수행의 이유에 기초해야 한다.
- (나) 고려해야 할 중요한 인자들은 투여의 경로(사람에서 가능한 노출 경로(들)에 근거한), 예측된 조직 분포 및 흡수, 대사의 역할과 시험물질 작용의 가능한 기전을 포함해야 한다.
- (다) 간은 가장 자주 연구된 조직이고 대부분의 자료들이 존재하므로 임의의 배경 정보가 없는 경우 및 특정 관심 조직이 밝혀지지 않은 경우 간의 시료채취는 생체 이물질 대사의 주요 부위로 정당화될 수 있고, 종종 원인 물질 및 대사물에 많이 노출된다.
- (라) 일부 직접 접촉부위(예, 경구투여 물질의 경우 선위 또는 십이지장/공장, 혹은 흡입 물질은 폐) 관찰인 경우가 가장 관련이 클 수 있다.
- (마) 추가 또는 대안적인 조직들은 수행되어진 시험의 특정한 이유에 근거하여 선택해

- (마) 야 하지만, 동시에 여러 조직을 다루는 능력 보이는 실험실에서 제공하는 같은 동물에서 여러 조직을 조사하기 위해 유용할 수 있다.

#### 5.4.8 표본의 준비

- (가) 다음의 5.4.8 (다)항에서 5.4.11 (너)항까지에서 설명된 과정들에서 모든 용액 또는 안정한 현탁액들은 그 유효기간 이내에 사용되어야 하거나, 필요한 경우 새로 제조해야하는 것이 중요하다.
- (나) 또한 (i) 부검 후 각 조직의 제거, (ii) 각 조직을 세포/핵 현탁액으로 만드는 과정과 (iii) 그 현탁액 및 슬라이드를 만드는 과정에 걸리는 시간은 모두 중요한 변수로 고려되어야 하고(용어의 정의 참조), 각 단계들에서 허용되는 시간은 방법의 확립 및 능력의 시연 동안 결정되어야 한다.
- (다) 동물들은 시험물질의 마지막 투여 후 적절한 시간에 인도적 희생이 되고, 효과적인 동물복지 법령과 3Rs 원칙에 부합되어야 한다.
- (라) 선택된 조직은 코멧 시험을 위해 제거, 해부, 일부만 선택되며, 조직의 같은 부위로부터 동시에 절단됨과 동시에 표준 방법에 따라 조직병리학적 분석이 가능한 포르말데히드 용액 또는 적절한 고정액에 놓여야 한다.
- (마) 코멧 시험을 위한 조직은 절단용 완충액에 놓여, 잔여 혈액을 제거하기 위해 차가운 절단 완충액으로 충분히 세척하고, 처리될 때까지 얼음처럼 차가운 절단 완충액에 저장해야 하며 간, 신장에서 원위치 관류도 수행할 수 있다.
- (바) 세포/핵 분리를 위한 많은 방법들이 보고되었으며, 간 및 신장과 같은 조직의 절단, 위장관의 경우 점막 표면을 긁어냄, 균질화 및 효소 분해를 포함한다.
- (사) JaCVAM 검증 시험은 단지 분리된 세포를 시험했고, 따라서 방법을 수립하고 능력을 보이기 위한 JaCVAM 시험자료들을 참조할 수 있다는 점에서 분리된 세포가 바람직하지만, 분리된 세포 또는 핵이 사용되었는지의 시험결과에 본질적인 차이는 없는 것으로 나타났으며, 세포/핵(예, 균질화, 절단, 효소 분해 및 채 거름)을 분리하는 다른 방법들은 유사한 결과들을 보였으므로, 분리된 세포 또는

(사) 격리된 핵을 사용할 수 있다.

(아) 실험실은 단일 세포/핵 분리의 조직-특이적 방법들을 철저하게 평가하고 검증해야 한다.

(자) 5.4.5에서 설명된 바와 같이 코멧 시험으로 검출되는 DNA 사슬 절단을 유도하는 일부 병변의 지속성은 매우 짧을 수 있으므로 단일 세포/핵 현탁액을 준비하는데 사용되는 어떤 방법을 사용해도, 동물을 인도적 희생시킨 후 가능한 빨리 조직을 처리하고 병변의 제거를 줄이는 조건(예, 낮은 온도에서 조직을 유지하여)에 놓는 것이 중요하다.

(차) 세포 현탁액은 사용 전까지 병액을 유지해야 하고 시료 간 변이가 최소화되고 적절한 양성 및 음성대조 반응을 나타낼 수 있어야 한다.

#### 5.4.9 슬라이드의 준비

(가) 슬라이드 준비는 단일 세포/핵 준비 이후 가능한 빨리(이상적으로는 1시간 이내에) 수행해야 하지만, 온도 및 동물 사망과 슬라이드 준비 사이의 시간이 엄격하게 제어되고 실험실 조건에서 검증해야 한다.

(나) 슬라이드를 만들기 위해 저융점 아가로스(일반적으로 0.5~1%)에 첨가하는 세포 현탁액의 부피는 저융점 아가로스의 비율이 0.45% 이하로 감소되지 않게 해야 한다.

(다) 최적의 세포 밀도는 코멧을 계수하는 데 사용되는 이미지 분석 시스템을 이용하여 결정한다.

#### 5.4.10 용해

(가) 용해 조건은 또한 중요한 변수이고 특정한 형태의 DNA 조작(특정 DNA 알킬화 및 염기 부가체)으로부터 생성되는 사슬 절단으로 인해 방해받을 수 있으므로 용해 조건은 실험에서 가능한 모든 슬라이드에 대해 일정하게 유지하는 것이 권장된다.



- (나) 일단 제조된 슬라이드는 예로서 황색 빛(또는 빛 차단)의 부드러운 조명 조건의 약 2~8℃ 냉장 용해 용액에 적어도 한 시간 동안(또는 밤새) 담가둬야 하며 자외선 구성요소를 포함할 수 있는 흰색 빛에의 노출을 피해야 한다.
- (다) 이 배양기간 후 염기성 사슬풀림 단계 이전에 슬라이드는 잔류 세제와 염을 제거하기 위해 세척해야 하며, 이것은 정제수, 중화 완충액 또는 인산 완충액을 사용하여 수행할 수 있다.
- (라) 전기영동 완충액도 또한 사용될 수 있으며, 이것은 전기영동 챔버 내의 염기성 조건을 유지하게 한다.

#### 5.4.11 사슬 풀기 및 전기영동

- (가) 슬라이드는 충분한 전기영동 용액을 포함하는 잠수형 전기영동 장치에 무작위로 놓이고 슬라이드의 표면이 완전히 잠기도록 해야 한다(커버의 두께는 또한 실행시마다 일치해야 함).
- (나) 활성 냉각, 순환과 대용량 전기와 같은 다른 형태의 코멧 시험 전기영동 장치에서는 전압이 일정하게 유지되는 동안 높은 용액 덮개를 공급하여 높은 전류 공급을 유지한다.
- (다) 균형 잡힌 설계는 전기영동 탱크 내에 슬라이드를 위치시키는 데 사용되어 탱크 내의 모든 흐름의 효과 또는 모서리 효과를 완화하고 배치 간 변동성을 최소화, 즉 각 전기영동 작동 시 시험의 각 동물에서, 다른 용량군의 시료에서, 음성 및 양성대조의 시료에서도 같은 수의 슬라이드를 포함해야 한다.
- (라) DNA를 풀기 위해 슬라이드는 적어도 20분 동안 놓여 있어야 하고, 통제된 조건에서 전기영동에 적용되어야 그 시험의 민감도와 동적 범위를 극대화 할 수 있다 (즉, 민감도를 극대화한 음성 및 양성대조 허용가능한 수준의 꼬리DNA의 백분율을 유도함).
- (마) DNA 이동의 수준은 전기영동의 지속기간과 선형적으로 관련되고 또한 전위(V/cm)와도 관련된다.

- (바) JaCVAM 시험에 근거하면 이는 적어도 20분 동안 0.7 V/cm가 될 수 있다.
- (사) 전기영동의 지속은 중요한 변수로 그 전기영동 시간은 동적 범위를 최적화하도록 설정되어야 한다.
- (아) 전기영동 시간(예, 감도를 극대화하기 위해 30분 또는 40분)을 더 길게 하면 일반적으로 알려진 돌연변이원과의 강한 양성 반응을 초래하지만 더 긴 전기영동 시간은 또한 대조 시료들에서 과도한 이동을 초래할 수 있다.
- (자) 각 실험의 전압은 일정하게 유지해야 하고, 다른 인자들의 변동은 시작 전류가 300 mA로 전달되는 0.7 V/cm의 JaCVAM 시험과 같이 좁고 특정한 범위 내에 존재해야 한다.
- (차) 완충용액의 깊이는 요구 조건을 달성하고 실험에 걸쳐 유지되도록 조절되어야 한다.
- (카) 전기영동 기간의 시작과 끝에서의 전류는 기록되어야 하므로 최적의 조건은 시험된 각 조직과 관련된 실험실에서 능력의 초기 시연 동안에 결정하여야 한다.
- (타) 사슬 풀림과 전기영동을 통한 전기영동 용액의 온도는 통상 2~10℃의 낮은 온도로 유지되어야 한다.
- (파) 사슬 풀림의 시작 시 전기영동 용액의 온도, 전기영동의 시작과 전기영동의 끝을 기록하여야 한다.
- (하) 전기영동의 완료 후, 슬라이드들은 중화 완충용액에 적어도 5분 동안 침지/세정하여야 한다.
- (거) 겔은 염색하여 “바로”(예, 1~2일 이내에) 계수 또는 추후 계수(예, 염색 후 1~2주 이내에) 하기위해 탈수할 수 있지만 그 조건은 능력의 시연 동안 검증되어야 하고 표준 자료들을 얻어 이들 각각의 조건들에서 개별적으로 유지하여야 하며, 후자의 경우, 슬라이드들은 무수에탄올에 적어도 5분 동안 담가 탈수시켜야 하고, 공기 건조하고 계수 시까지 실온 또는 냉장고 내의 용기에 저장한다.

## 5.4.12 측정 방법

- (가) 코멧은 자동화 또는 반자동화된 이미지 분석 시스템을 이용하여 정량적으로 계수하여야 한다.
- (나) 슬라이드들은 예로서 SYBR Gold, Green I, 요오드화 프로피듐 또는 브롬화 에티듐의 적절한 형광 염색으로 염색되고 적합한 배율(예, 200배)의 형광과 적절한 검출기 또는 디지털(예, CCD) 카메라를 장착한 현미경으로 측정한다.
- (다) 세포는 코멧 이미지 지도에 기술된 바와 같이 계수가능, 계수불가능 및 “헷지혹”(hedgehog)의 세 가지 범주로 구분될 수 있다(추가 토론을 위해 5.4.13 (자)에서 (타)까지 참조).
- (라) (인접 세포와의 간섭 없이 명확히 정의된 머리와 꼬리를 갖는) 계수가능한 세포들만이 인공물을 피하기 위한 꼬리DNA의 백분율로 계수하여야 하며, 계수불가능 세포들의 빈도를 보고할 필요는 없다.
- (마) 헷지혹의 빈도는 적어도 시료 당 150개의 시각화 점수에 근거하여 결정하여야 하고(명확히 규정된 머리는 이미지 분석으로 잘 감지되지 않음을 의미할 것임, 추가 토론을 위해 5.4.13 (자)에서 (타)까지 참조) 각각 문서화하여야 한다.
- (바) 양성 및 음성대조를 포함하는 분석을 위한 모든 슬라이드들은 독립적으로 코딩되고 “맹검법”으로 계수되어 계수자가 그 처리 조건을 알 수 없어야 한다.
- (사) (동물 당 조직별) 각 시료에 대해 적어도 150개 세포(헷지혹 제외 - 5.4.13 (자)에서 (타)까지 참조)가 분석하여야 한다.
- (아) 용량 당 적어도 다섯 마리의 동물들에서 동물 당 150개 세포의 계수(동시 양성대조에서 더 적은 - 5.3.1 참조)는 Smith 등(2008)의 분석에 따라 적절한 통계력을 제공한다.
- (자) 슬라이드들이 사용되면, 군 당 다섯 마리의 동물이 사용될 때 시료 당 둘 또는 세 개의 슬라이드에서 계수할 수 있다.

- (차) 슬라이드의 여러 영역들은 꼬리의 중복이 없음을 보장하는 밀도에서 관찰해야 한다.
- (카) 슬라이드 가장자리에서의 계수는 피해야 한다.
- (타) 코멧 시험에서 DNA 사슬 절단은 꼬리DNA의 백분율, 꼬리 길이 및 꼬리 모멘트와 같은 독립적 종말점으로 측정할 수 있다.
- (파) 적절한 이미지 소프트웨어 분석시스템이 사용되는 경우 모두 3회의 측정이 가능할 수 있다.
- (하) 하지만 그 꼬리DNA의 백분율(또한 꼬리강도의 백분율이라고도 함)는 평가 및 결과의 해석을 위해 권장되고, 세포의 전체 강도의 백분율로 표현되는 꼬리에서의 DNA 분절 강도에 의해 결정된다.

#### 5.4.13 조직 손상 및 세포독성

- (가) 코멧 시험에서 양성 결과들은 전적으로 유전독성에 기인하지 않을 수 있으며, 표적 조직 독성은 또한 DNA 이동이 증가하는 결과를 나타낼 수 있다.
- (나) 반대로 낮거나 중간 정도의 세포독성은 종종 알려진 유전독성물질에서 나타나고, 이는 유전독성에 의해 유도된 DNA 이동과 코멧 시험 자체에서의 세포독성으로 유도된 DNA 이동을 구별할 수 없음을 보이고 있지만, DNA 이동의 증가가 관찰되는 경우, 결과의 해석에 도움을 줄 수 있는 하나 이상의 세포독성 지표의 검사가 권장된다.
- (다) 세포독성의 명백한 증거의 존재에서 DNA 이동의 증가는 신중하게 해석되어야 한다.
- (라) 세포독성의 많은 측정법들이 제안되었고 이들 조직병리학적 변화들은 조직 독성의 관련 측정을 할 수 있다.
- (마) 염증, 세포 침습, 세포 사멸이나 괴사 변화와 같은 관찰들은 DNA 이동에서의 증

- (마) 가와 관련되지만, JaCVAM 검증 시험으로 보인 바와 같이 조직병리학적 변화의 결정적 목록은 항상 증가된 DNA 이동의 관찰과 관련된다.
- (바) 임상화학 측정(예, AST, ALT)의 변화는 조직 손상에 대한 유용한 정보에 더해 고려될 수 있는 카스파제(Caspase) 활성화, TUNEL 염색, Annexin V 염색 등과 같은 추가적 지표에 대한 유용한 정보를 제공할 수 있지만, 후자가 생체 내 시험에서 사용된 제한적 발행 자료들이 있고, 일부는 다른 것들보다 신뢰가 떨어질 수 있다.
- (사) 헛지혹(또는 구름, 유령세포들)은 작거나 존재하지 않은 머리와 큰 흩어진 꼬리로 구성된 현미경 상의 이미지를 나타내고, 비록 헛지혹의 원인은 불확실하지만 심하게 손상된 세포들로 간주된다(부록 2 참조).
- (아) 외관으로 인해 이미지 분석에 의한 꼬리DNA의 백분율 측정은 신뢰할 수 없고 따라서 헛지혹은 별도로 평가하여야 한다.
- (자) 헛지혹의 발생은 기록되고 보고되어야 하며 관련된 모든 증가는 시험물질이 조심스럽게 조사 및 해석되어야 하기 때문인 것으로 생각된다.
- (차) 시험물질의 잠재적 활성화 모드에 대한 지식은 이런 고려사항에 도움이 될 수 있다.

## 6. 자료 및 보고

### 6.1 결과의 처리

- 6.1.1 동물은 실험단위이며 따라서 개별 동물 자료들과 요약된 결과들은 표의 형태로 제시하여야 한다.
- 6.1.2 그 자료들의 계층적 특성으로 인해 각 슬라이드의 꼬리DNA의 백분율 중앙값을 결정하고 각 동물에서 중앙값의 평균을 계산하는 것이 권고된다.

6.1.3 개별 동물의 평균의 평균은 이후 군 평균을 제공하는 것으로 결정된다.

6.1.4 이 모든 값들은 보고서에 포함되어야 하고, 대안적 접근들(5.4.12 (타)에서 (하)까지 참조)은 과학적 및 통계적으로 정당화된 경우 사용할 수 있다.

6.1.5 통계적 분석은 다양한 접근방식을 사용하여 수행할 수 있다.

6.1.6 사용될 통계적 방법을 선택할 때 자료 및/또는 0의 값 효과를 완화하기 위해 모든 (심지어 0이 아닌 것까지) 모든 값에 작은 수(예, 0.001)을 추가하는 변환에 대한 필요성은 위의 참고문헌에서 논의된 바와 같이 고려하여야 한다.

6.1.7 두 성별이 모두 사용될 때 투여/성별 상호작용의 세부 분석과 차이가 있거나 없을 때의 자료의 후속 분석은 부록 2에 제시하였다.

6.1.8 독성 및 임상 증상에 대한 자료들도 또한 보고하여야 한다.

## 6.2 수용 기준

6.2.1 시험의 수용은 다음의 기준에 기초한다.

(가) 동시 음성대조는 4.4.1에서 4.4.6에 기술된 것과 같은 실험실의 표준 음성대조 데이터베이스에 추가하여 적합하다고 간주된다.

(나) 동시 양성대조(5.3.1 참조)는 표준 양성대조 데이터베이스에서 생성된 것들과 호환되는 반응을 유도하고 동시 음성대조와 비교하여 통계적으로 유의한 증가를 생성해야 한다.

(다) 적절한 수의 세포 및 용량이 분석되어야 한다(5.4.12 (가)에서 (나)까지 및 5.4.3).

(라) 최고 용량의 선택에 대한 기준은 5.4.3 (가)에서 (마)까지 기술한 것들과 일치한다.

## 6.3 결과의 평가 및 해석

6.3.1 아래의 모든 수용 기준이 충족되면 시험물질은 명백히 양성인 것으로 간주된다.

(가) 적어도 한 개의 시험 용량이 동시 음성대조에 비해 통계적으로 유의한 증가를 나타낼 때.

(나) 그 증가가 적절한 추세 시험으로 평가할 때 용량-관련 증가될 때.

(다) 그 모든 결과가 주어진 중, 매개물질, 경로, 조직 및 투여횟수에서 표준 음성대조 자료들의 분포를 벗어날 때.

6.3.2 이 모든 기준이 충족될 때, 그 시험물질은 이 시험계의 조직에서 DNA 사슬 절단을 유도할 수 있는 것으로 간주한다.

6.3.3 이 기준들의 하나 혹은 둘 만 충족하는 경우는 6.3.7에서 6.3.8까지 참조할 것.

6.3.4 아래의 모든 수용기준이 충족되면 시험물질은 명백히 음성인 것으로 간주한다.

(가) 시험농도의 모두가 동시 음성대조에 비해 통계적으로 유의한 증가를 나타내는 것이 없을 때.

(나) 적절한 추세 시험으로 평가할 때 용량-관련 증가가 없을 때.

(다) 모든 결과가 주어진 중, 매개물질, 경로, 조직 및 투여횟수에서 표준 음성대조 자료들의 분포 안에 있을 때.

(라) 노출, 독성, 표적 조직(들)을 입증하는 직간접적 증거가 제시되었을 때.

6.3.5 이후 그 시험물질은 이 시험계의 조직에서 DNA 사슬 절단을 유도할 수 있는 것으로 간주한다.

6.3.6 명백히 양성이거나 음성인 반응의 검증은 필요하지 않다.

6.3.7 명백히 음성도 양성도 아닌 반응의 경우 (예, 6.3.1에서 6.3.3까지 또는 6.3.4에서

6.3.7 6.3.5까지 나열된 모든 기준들에 충족되지 않음) 및 결과의 생물학적 관련성을 수립하는데 지원하기 위해, 그 자료들은 과학적으로 정당화된 경우 전문가의 판단과/또는 추가 조사를 수행함으로써 평가하여야 한다.

6.3.8 추가 세포들의 계수(적절한 경우) 또는 최적화된 실험 조건을 사용하여 가능한 반복실험의 수행(예, 투여 간격, 다른 투여 경로, 다른 시료채취 시간 또는 다른 조직들)은 유용할 수 있다.

6.3.9 드문 경우 추가 조사 후에도 그 자료 모음은 양성 또는 음성 결과의 결론을 배제할 것이므로 모호한 결론을 내게 된다.

6.3.10 양성 또는 모호한 결과의 관련성을 평가하기 위해, 표적 조직에서 세포독성에 관한 정보들이 요구될 것이다. (5.4.13 (가)에서 (아)까지 참조)

6.3.11 양성 또는 모호한 결과들이 세포독성의 명백한 증거로 존재하는 것만이 관찰되는 경우, 최종 결론을 뒷받침하기에 충분한 증거가 없으면 그 시험은 모호한 유전독성으로 결론 내리게 된다.

6.3.12 모든 시험 용량에서 독성의 징후가 있는 음성 시험결과인 경우 비독성 용량에서 추가 시험이 바람직할 수 있다.

## 6.4 시험 보고

6.4.1 시험의 결과보고는 다음을 포함해야 한다.

### (1) 시험물질

(가) 입수원, 가능한 경우 로트 번호

(나) 시험물질의 안정성, 사용기한 또는 알려진 경우 재분석일

### (2) 단일 구성 물질



(가) 물리적 성상, 수용해도 및 이에 상응하는 추가 물리화학적 성질

(나) IUPAC 또는 CAS명 등의 화학물질명, SMILES 또는 InChI 코드, 구조적 성상, 순도, 적절하고 실용적으로 가능한 불순물의 화학적 성질 등

(3) 다구성 물질, UVBCs 및 혼합물

(가) 화학적 성질, 정량적 발생과 구성분 관련된 상대적 성질로는 특징지어지지 않는다.

(4) 용매/매개물질

(가) 용매/매개물질의 선택을 위한 정당성

(나) 알려진 경우, 용매/매개물질에서 시험물질의 용해도 및 안정성

(다) 투여 제제의 준비

(라) 제제에 대한 분석 결정(예, 안정성, 균질성, 공칭 농도)

(5) 시험동물

(가) 사용된 종/품종 및 그 선택에 대한 과학적 윤리적 정당성

(나) 동물의 수, 주령 및 성별

(다) 입수원, 사육 조건, 식이, 풍부하게 함 등

(라) 시험의 시작과 끝에서 각 군에 대한 체중 범위, 평균 및 표준편차를 포함하는 각 동물의 체중

(6) 시험 조건들

- (가) 양성 및 음성(매개물질/용매) 대조군 자료
- (나) 수행한 경우 범위-결정 시험의 결과
- (다) 용량 수준 선택의 이론
- (라) 시험물질 제조의 세부사항
- (마) 시험물질 투여의 세부사항
- (바) 투여의 경로에 대한 근거
- (사) 주사의 위치(피하 또는 정맥 시험에서)
- (아) 가능한 경우 시료 준비의 방법, 특히 양성 코멧 반응을 갖는 물질의 경우는 조직 병리학적 분석
- (자) 조직 선택의 이론적 근거
- (차) 만일 음성 결과가 얻어진 경우 시험물질이 표적 조직 또는 일반 순환에 도달하는 것을 증명하는 방법
- (카) 적용 가능한 경우 식이/음용수 시험물질 농도 (ppm) 및 소비량으로 계산한 실제 용량 (매일 체중 kg 당 mg)
- (타) 식이 및 음용수질의 세부사항;
- (파) 처리 및 시료채취 일정과 선택의 정당성에 대한 자세한 설명 (예, 가능한 경우 독성 동태학 자료)
- (하) 통증 완화, 진통의 방법
- (거) 인도적 희생의 방법

(너) 조직을 분리하고 보존하는 절차

(더) 단일 세포/핵 현탁액의 제조 방법

(러) 모든 시약의 공급처와 로트 번호(가능한 경우)

(머) 세포독성 평가의 방법

(버) 전기영동 조건

(서) 사용된 염색 기법

(어) 계수 및 코멧 측정 방법

(7) 결과

(가) 시험기간 전 및 동안에 있는 경우에는 각 동물에 대한 일반 임상 관찰

(나) 수행한 경우 세포독성의 증거

(다) 1주 이상의 시험에서: 체중 범위를 포함하는 시험 기간 중 각 체중, 각 군의 평균 및 표준편차; 식이 소비량

(라) 명백한 경우 용량-반응 관계

(마) 각 조직/동물에서, 각 슬라이드 당 꼬리DNA의 백분율(또는 다른 측정을 선택한 경우) 및 평균값과 동물 당 평균값 및 군 당 평균값

(바) 동시에 과거력 음성대조 자료와 범위, 평균/중앙값 및 각 조직에서 평가한 표준편차

(사) 동시에 과거력 양성대조 자료

(아) 간 이외의 조직에서, 양성대조에 사용된 양-반응 곡선. 이것은 확실성을 보이는 동안 수집된 자료들로부터 얻을 수 있고 정당성, 최신 문헌에 인용되고, 그 조직에서 대조군에 대응하는 크기와 분산의 적절성이 수반되어야 함

(자) 통계적 분석 및 응용한 방법들

(차) 양성, 음성 또는 의양성으로 고려한 기준; 각 군 및 동물 당 헷지혹의 빈도

(8) 결과에 대한 토의

(9) 결론

(10) 참고문헌

## 7. 참고문헌

- (1) Rothfuss, A. et al. (2010), Collaborative study on fifteen compounds in the rat-liver Comet assay integrated into 2-and 4-week repeat-dose studies, Mutation Research, Vol., 702/1, pp. 40-69.
- (2) OECD (2014), Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens, Series on Testing and Assessment, Nos. 195 and 196, OECD Publishing, Paris.
- (3) Smith, C. C, et al. (2008), Recommendations for design of the rat Comet assay, Mutagenesis, Vol. 23/3, pp. 233-40.

## <부록 1> 생체내 코멧 시험에서 성별 차이를 식별하기 위한 요인설계 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, Genstat와 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 동물군에서 복제 동물들 간의 변동성의 추정에 대해 시험된다. 근본적인 방법론의 자세한 내용은 많은 표준 통계 교과서들 및 통계 패키지와 함께 제공되는 ‘도움말’에서 얻을 수 있다.
4. 그 분석은 ANOVA 표<sup>1)</sup>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.

## <부록 2> 본 시험의 제한점

지식의 현재 상태로 인해, 여러 가지 제한들이 생체 내 코멧 시험과 관련된다. 이 제한들은 그 시험이 규제 맥락에서 안전 문제에 응답하도록 응용하고자 하는 더 많은 경험들이 있으므로 감소되거나 더 좁게 정의될 것으로 예상된다.

1. 일부 형태의 DNA 손상은 단기, 즉 마지막 용량 후 24시간 이상에서 관찰될 만큼 빠르게 복구될 수 있다. 단기 손상 유형의 어떠한 식별 목록도, 이 형태의 손상을 일으킬 가능성이 있는 물질의 목록도, 이 유형의 손상이 검출될 수 있는 기간이 알려져 있지 않다. 최적의 시료채취 시간은 또한 물질- 또는 경로-특이적일 수 있고 시료채취 시간은 이런 자료들이 사용가능할 때 동태학적 자료들(예로서 혈장 또는 조직 농도의 최고치가 달성되는 시간, Tmax)로부터 결정되어야 한다. 이 지침을 지원하는 대부분의 검증 연구들은 최종 용량의 투여 후 2~3시간에 부검으로써 특정된다. 발간된 문헌에서 대부분의 시험들은 도살 전 2~6시간 사이에 최종 용량의 투여를 제시한다. 따라서 이러한 경험들은 시험 지침에서 권장한 기준으로 사용되었고, 자료의 부재 시에는 기 타, 최종 용량이 부검 이전 2~6시간 사이의 특정 시간대에 투여해야 한다.
2. 위관 영양법으로 투여되는 것에 비해 사료나 음용수로 투여 후 단기 DNA 손상의 검출 시험의 민감도를 조사하는 식별 가능한 시험자료들은 없다. DNA 손상은 사료나 음용수로 투여 후 검출되지만, 위관 영양법과 복강 내 투여에 더 많은 경험과 비교한 보고들은 상대적으로 거의 없다. 따라서 그 시험의 민감도는 사료 또는 음용수를 통해 투여된 단기 손상을 유발하는 물질들에서 저감될 수 있다.
3. 간과 위 이외에 수행된 실험실간 시험은 없으며, 따라서 양성 및 음성대조 범위로 예상되는 간 이외의 조직에서 민감하고 재현성 있는 반응을 달성하는 방법을 설정되어 있지 않다. 간에서는 음성대조값의 하한을 설정하는 합의에 도달할 수 없다.
4. 비록 시험관 내(in vitro)의 세포독성 혼란 효과를 보이는 여러 가지 발행물이 있지만, 생체 내(in vivo)에서는 발행된 자료들이 거의 없으며 따라서 권장되는 세포독성의 단일 측정은 없다. 염증, 세포 침습, 세포 사멸 또는 괴사 변경과 같은 조직병리학적 변화들은 DNA 이동의 증가와 관련이 있지만, JaCVAM 검증시험(OECD, 2014)에서 보여진 바와 같이 이 변화들은 항상 양성 코멧 결과를 나타내지는 않고 따라서 항상 DNA 이동이 증가되는 것과 관련된 조직병리학적 변화의 확실한 목록은 사용할 수 없

4. 다. 헛지혹(또는 구름, 유령 세포)들은 이전에 세포독성의 지표로 제시되었지만, 헛지혹의 병인은 불확실하다. 물질-관련 세포독성, 시료 준비기간 동안 시작되는 기계적/효소-유래 손상과/또는 시험물질 유전독성의 더욱 극단적인 효과로 인해 발생할 수 있음을 제안하는 자료들은 존재한다. 다른 자료들은 광범위하지만, 아마도 복구 가능한 DNA 손상으로 인한 것으로 보인다.
5. 조직 또는 세포핵은 나중의 분석을 위해 성공적으로 동결되었다. 이는 보통 매개물질에의 반응에 대한 측정 가능한 효과 및 양성대조로 된다. 사용하는 경우, 실험실은 동결 방법에서 역량을 보여야 하고 매개물질 처리한 동물의 표적 조직에서 꼬리DNA의 백분율의 허용가능한 낮은 범위를 확인하고, 양성 반응은 여전히 검출 가능할 수 있어야 한다. 문헌에서 조직의 동결은 다른 방법을 사용하여 설명되었다. 하지만, 현재 조직을 가장 잘 동결 및 해동하는 지, 잠재적으로 변경된 반응이 그 시험의 민감도에 영향을 미칠 수 있는지를 시험하는 방에 대한 합의는 없다.
6. 최근의 연구는 중요한 변수의 목록이 더욱 짧아질 것으로 예상되고, 중요한 변수의 매개변수를 더욱 정확하게 정의하는지 보여준다.

## 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