

KOSHA GUIDE

T - 29 - 2018

화학물질에 의한 시험관내 포유류 세포의  
Hprt 및 Xprt 유전자 변이시험지침

2018. 10.

한국산업안전보건공단

## 안전보건기술지침의 개요

- 작성자 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 임 경 택
- 제정 경과
  - 2018년 09월 12일 산업독성분야 제정위원회 심의
- 관련규격 및 자료
  - OECD Test guideline TG 476 In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Tests using the Hprt and Xprt genes, 2016
- 관련법규·규칙·고시 등
  - 산업안전보건법 제39조(유해인자의 관리 등)
  - 산업안전보건법 시행규칙 제81조(유해인자의 분류·관리)
  - 고용노동부 고시 제2015-74호(화학물질의 유해성·위험성 시험 등에 관한 기준)
  - 국립환경과학원 고시 제2018-12호(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.

공표일자 : 2018년 10월 11일

제 정 자 : 한국산업안전보건공단 이사장

## 화학물질에 의한 시험관내 포유류 세포의 Hprt 및 Xprt 유전자 변이시험지침

### 1. 목 적

이 지침은 산업안전보건법 및 고용노동부 고시에 따라 화학물질의 유전자 변이원성 평가를 위해 Hprt 및 Xprt 유전자를 이용한 시험관내 포유류 세포 유전자 변이시험의 수행을 위한 시험 방법의 제안을 목적으로 한다.

### 2. 적용범위

이 지침은 산업안전보건법 및 고용노동부 고시에 의거 Hprt 및 Xprt 유전자를 이용한 시험관내 포유류 세포 유전자 변이시험의 수행을 위한 시험 방법 및 결과의 작성에 적용한다.

### 3. 용어의 정의

(1) 이 지침에서 사용하는 용어의 뜻은 다음과 같다.

(가) “염기쌍 치환 돌연변이 유발 물질(Base pair substitution mutagens)”이란 DNA에서 염기쌍을 치환하는 물질을 말한다.

(나) “복제 효율(Cloning efficiency)”이란 셀 수 있을 정도까지 자랄 수 있는 저밀도로 깔려있는 세포의 백분율을 말한다.

(다) “세포 독성(Cytotoxicity)”이란 음성대조군과 비교하여 처리된 세포의 상대적 생존율 감소로 확인되는 시험물질의 특성을 말한다.

(라) “전방 돌연변이(Forward mutation)”란 부모형에서 돌연변이 형태로의 유전자

돌연변이를 말하며, 효소 활성 또는 암호화된 단백질의 기능이 변경되거나 손실될 수 있다.

(마) “틀밀림 돌연변이 유발 물질(Frameshift mutagens)”이란 DNA 분자에서 단일 또는 다중 염기쌍의 추가 또는 결실을 유발하는 물질을 말한다.

(바) “유전독성(Genotoxic)”이란 DNA 절단, 부가체, 재배열, 돌연변이, 염색체 이상 및 이배체 등을 포함하는 모든 유형의 DNA 또는 염색체 손상을 포괄하는 일반적인 용어로서, 유전 독성 효과의 모든 유형이 돌연변이 또는 안정한 염색체 손상을 일으키는 것은 아니다.

(사) “HAT 배지”란 Hyptantine, Aminopterin 및 Thymidine을 함유한 배지로서, Hprt 돌연변이체의 정화에 사용된다.

(아) “체세포분열재조합(Mitotic recombination)”이란 유사분열 중에 유전적으로 결합한 염색체 간의 재조합으로 인해 DNA 이중 가닥이 끊어지거나 이형 접합성(heterozygosity)이 없어지는 것을 말한다.

(자) “MPA 배지”란 크산틴(Xanthine), 아데닌(Adenine), 티미딘(Thymidine), 아미노프테린(Aminopterin) 및 마이코페놀산(Mycophenolic acid)을 함유하는 배지로 Xprt 돌연변이체를 세정하는데 사용된다.

(차) “변이원성(Mutagenic)”이란 유전자 또는 염색체 구조(염색체 이상)에서 DNA 염기쌍 염기 서열의 유전적 변화를 일으키는 성질을 말한다.

(카) “돌연변이 빈도(Mutant frequency, MF)”란 관찰된 돌연변이체의 수를 선택 배지에 깔려있는 세포의 수로 나눈 값으로, 선택시 복제 효율 (또는 생존력)을 위해 보정된다.

(타) “표현형 발현 시간(Phenotypic expression time)”이란 유전자 변형이 계놈 내에서 고정되고 기존의 유전자 산물의 표현형 특성이 변경되는 시점까지 고갈되는 동안 치료 후 시간을 말한다.

(파) “상대 생존(Relative survival; RS)”이란 치료와 관련된 세포 독성의 척도로 사용되며, 음성대조군(100%의 생존율을 나타냄)에서의 클로닝 효율과 비교하여 치료 동안 세포 손실에 의해 조정된 치료 직후에 깔려 있는 세포의 복제 효율(CE)을 말한다.

(하) “S9 간 분획(S9 Mix)”이란 9,000g 원심 분리 후 간 균질물의 상등액으로, 대사 효소 활성화에 필요한 간 S9 분획 및 보조 인자의 혼합을 말한다.

(거) “용매 제어(Solvent control)”란 시험 화학물질을 용해시키기 위해 사용되는 용매만을 받는 대조군 배양액을 말한다.

(너) “치료되지 않은 대조군”이란 치료를 받지 않았지만(즉, 시험 화학물질도 용매도 없음) 시험 화학물질을 수용하는 배양액과 동일한 방법으로 동시에 처리되는 배양액을 말한다.

(2) 기타 이 지침에서 사용하는 용어의 정의는 특별한 규정이 있는 경우를 제외하고는 산업안전보건법, 동법시행령, 동법시행규칙 및 고용노동부 고시에서 정의하는 바에 의한다.

## 4. 시험 개요

### 4.1 개요

(1) 체외 포유류 세포 유전자 돌연변이 시험의 목적은 화학물질에 의해 유발된 유전자 돌연변이를 검출하는 것이다.

(2) 이 시험에서 사용된 세포주는 내인성 하이포크산틴-구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라아제 유전자(설치류 세포의 Hprt, 아울러 사람세포의 HPRT도 이 가이드라인에서 포함)의 전방 돌연변이를 측정한다.

(3) 크산틴-구아닌 포스포리보스 전환효소의 형질전환 유전자(Xanthine-guanine phosphoribosyl transferase transgene)인 HPRT 및 Xprt 돌연변이 시험은 다양

한 유전자 변이를 검출한다.

- (4) 형질전환 유전자의 상염색체 위치는 HPRT 검사(예: 염기쌍 치환, 틀 이동, 작은 결실 및 삽입)에 의해 검출된 돌연변이 현상 이외에 HPRT에 의해 검출되지 않는 큰 결실 및 유사분열 재조합으로 인한 돌연변이를 검출할 수 있다.
- (5) 본 시험은 Hprt 유전자가 X염색체에 위치해 있기에 가능하며, Xprt는 현재 규제 목적으로는 HPRT 시험보다 덜 널리 사용되고 있다.

#### 4.2 초기 고려사항

- (1) 시험관내에서 수행되는 시험은 일반적으로 외인성 대사활성화계를 사용해야 한다. 외인성 대사활성화계는 생체내 조건을 완전히 모방하지는 않는다.
- (2) 시험물질과 세포의 유전물질 사이에 직접적인 상호작용에 기인하지 않는 인위적 양성 결과(즉, 시험계와의 가능한 상호작용)로 이어질 수 있는 조건을 피하도록 주의해야 한다.
- (3) 이런 조건은 pH 또는 삼투압의 변화, 배지성분과의 상호작용 또는 과도한 수준의 세포독성을 포함한다.
- (4) 아래에 정의된 권장 세포독성 수준을 초과하는 세포독성은 HPRT 검사에서 과도한 것으로 간주된다.
- (5) 혼합물의 시험에 대한 규제요건이 있는 경우를 제외하고, 규제 목적의 자료를 생성하기 위해 혼합물에 관한 시험에 이 지침을 적용하는 경우는 그 목적에 적절한 결과를 제공할 수 있는지 여부를 고려해야 한다.

#### 4.3 시험법의 원리

- (1) Xprt 또는 HPRT 시험에서 Xprt 효소활성 및 Hprt 효소활성이 결핍된 돌연변이 세포는 퓨린 유사체인 6-thioguanine(TG)의 세포증식 억제효과를 나타낸다.

- (2) Hprt(HPRT 시험) 또는 gpt(Xprt 시험) 만능세포는 TG에 민감하여 세포대사를 억제하고 세포분열을 더 이상 일으키지 않는다.
- (3) 따라서 돌연변이 세포는 TG 존재 하에서 증식할 수 있는 반면, Hprt(HPRT 시험) 또는 gpt(Xprt 시험) 효소를 함유하는 정상 세포는 그렇지 않다.
- (4) 현탁액 또는 단층 배양된 세포는 적당한 시간(3~6 시간) 동안 외인성 대사체의 유무에 관계없이 시험물질에 노출시킨 후 세포독성을 결정하고 돌연변이체 선택 이전의 표현형 발현을 위해 부차배양(sub-culture) 한다.
- (5) 세포독성은 상대생존(RS), 즉 처리 직후에 측정된 복제 효율 및 음성대조군과 비교한 처리 중 임의의 세포 손실에 대해 조정함으로써 결정된다.
- (6) 처리된 배양물은 유도된 돌연변이(보통 최소 7~9일)의 거의 최적의 표현형 발현을 가능하게 하기 위해 충분한 기간 동안 성장배지에서 배양한다.
- (7) 표현형 발현 후, 돌연변이체의 빈도는 돌연변이 콜로니를 검출하기 위한 선별제를 함유하는 배지에 세포를 접종하고, 클로닝 효율(생존 능력)을 결정하기 위한 선별제 없이 배지에 접종한다.
- (8) 적절한 배양시간 후, 콜로니를 계수한다. 돌연변이 빈도는 돌연변이체 선택 시 복제 효율에 의해 보정된 돌연변이 콜로니 수에 기초하여 계산한다.

## 5. 시험 방법

### 5.1 세포

- (1) HPRT 및 Xprt 검사에 사용된 세포유형은 화학적 돌연변이 유발물질에 대한 민감성, 높은 복제 효율, 안정한 핵형 및 자연발생 돌연변이 빈도가 입증되어야 한다.
- (2) HPRT 시험에서 가장 일반적으로 CHO, CHL 및 V79 세포주의 Chinese

Hamster 세포, L5178Y 마우스 림프종 세포 및 TK6 인간 림프구 세포가 사용된다.

- (3) gpt 도입 유전자를 함유하는(및 Hprt 유전자가 결실된) CHO 유래 AS52 세포가 Xprt 시험에 사용되는데, hprt 유전자가 삭제되었기 때문에 AS52 세포에서 HPRT 검사를 수행할 수 없다.
- (4) 다른 세포주의 사용은 검증이 필요하다.
- (5) 세포주는 염색체 수의 안정성과 마이코플라스마 오염이 없음을 일상적으로 검사해야 하며, 감염된 경우 또는 염색체 수가 변경된 경우 세포를 사용해서는 안 된다.
- (6) 시험에서 사용되는 정상적인 세포주기 시간이 결정되어야 하며 공개된 세포 특성과 일치해야 한다.
- (7) 마스터 세포주의 자발적 돌연변이 빈도도 검사해야 하며, 돌연변이 빈도가 허용 범위를 벗어난 경우 보관본을 사용하지 않아야 한다.
- (8) 이 시험에 사용하기 전에, HPRT 시험을 위한 HAT 배지 및 Xprt 시험을 위한 MPA 배양과 같은 기존의 돌연변이 세포를 배양해야 할 수도 있다.
- (9) 정화된 세포는 냉동보존 후 해동하여 사용할 수 있다.
- (10) 정상적인 배가시간에 도달하면 새로 해동된 재고를 시험에 사용할 수 있으며, Xprt 시험을 수행할 때 AS52 세포의 일상 배양은 gpt 이식유전자의 유지를 보장하는 조건을 사용해야 한다.

## 5.2 배지 및 배양 조건

- (1) 배양을 유지하기 위해서는 적절한 배양배지 및 배양조건(배양용기, 5% CO<sub>2</sub> 및 37℃)을 사용해야 한다.



- (2) 세포 배양물은 대수기(log phase) 번식을 보장하는 조건 하에서 항상 유지되어야 한다.
- (3) 발현 기간 동안 세포의 최적성장을 보장하고 돌연변이 및 비돌연변이 세포 모두 최적의 복제효율을 보장하는 배지 및 배양조건을 선택하는 것이 특히 중요하다.

### 5.3 배양 준비

- (1) 세포주는 현탁액 또는 단일층의 세포가 처리 및 발현 기간동안 계속해서 성장할 수 있는 밀도로 배양배지에 접종되어야 한다.

### 5.4 대사활성화

- (1) 내인성 대사능력이 불충분한 세포를 사용할 때는 외인성 대사체계를 사용해야 한다.
- (2) 기본적으로 권장되는 가장 일반적으로 사용되는 시스템은 Aroclor 1254와 같은 효소유도제로 처리한 설치류(일반적으로 랫드)의 간에서 준비한 공동인자 보충 후 미토콘드리아 분획물(S9) 또는 페노바르비탈-나프토플라본의 조합물이다.
- (3) 후자의 조합은 잔류성 유기 오염물질에 관한 스톡홀름 협약과 충돌하지 않으며 혼합가능 산화효소를 유도하기 위해 Aroclor 1254만큼 효과적임이 입증되었다.
- (4) S9 분획은 전형적으로 1% 내지 2%(v/v)의 농도로 사용되지만, 최종 시험배지에서 10%(v/v)까지 증가시킬 수 있다.
- (5) 채택된 외인성 대사활성화계 또는 대사 유도제의 유형과 농도의 선택은 시험물질에 따라 달라진다.

### 5.5 시험물질의 준비

- (1) 고체 시험물질은 적절한 용매로 조제하고 필요하다면 희석하여 세포를 처리해야 한다.

- (2) 액체 시험물질은 시험계에 직접 추가하거나 시험계를 처리하기 전에 희석할 수 있다.
- (3) 기체 또는 휘발성 시험물질은 밀봉된 배양용기에서의 처리와 같은 표준 프로토콜을 적절히 수정하여 시험해야 한다.
- (4) 안정성 자료에서 저장 가능성이 검증되지 않는 한, 시험물질의 준비는 처리 직전에 해야 한다.

## 5.6 시험조건

### 5.6.1 용매

- (1) 용매는 세포성장을 변화시키고, 시험물질의 안전성에 영향을 미치며, 배양용기와 반응하여 대사활성화계를 손상시키는 등 시험 수행에 악영향을 미치지 않으면서 시험물질의 용해도를 최적화하도록 선택해야 한다.
- (2) 가능하면 수성용매(또는 배양배지)의 사용을 먼저 고려해야 한다. 잘 결정된 용매의 예로는 물 및 디메틸설폭사이드(DMSO)가 있다.
- (3) 일반적으로 유기용매는 최종 처리 매질에서 1%(v/v)를 넘지 않아야 하고 수성용매(염수 또는 물)는 10%(v/v)를 초과해서는 안 된다.
- (4) 사용된 용매가 잘 결정되어 있지 않은 경우(예: 에탄올 또는 아세톤) 사용된 농도에서 시험물질 및 시험계와의 상용성 및 유전독성의 부재를 나타내는 자료를 사용하여 보완해야 한다.
- (5) 그러한 자료가 없다면, 선택된 용매에 해로운 영향이나 돌연변이 유발효과가 나타나지 않는다는 것을 검증하기 위해 미처리 대조군을 추가하는 것이 중요하다.

## 5.7 세포독성 측정 및 노출농도 선택

- (1) 가장 높은 시험물질 농도를 결정할 때 과도한 세포독성, 배양 배지에서의 침전, pH

또는 삼투압의 현저한 변화와 같이 인위적 반응을 일으킬 수 있는 농도는 피해야 한다.

- (2) 시험물질 첨가 시 배지의 pH에서 현저한 변화를 일으키는 경우 최종처리 배지를 완충시켜 인위적 양성 결과를 피하고 적절한 배양 조건을 유지함으로써 pH를 조정할 수 있다.
- (3) 농도선택은 세포독성 및 기타 고려사항에 기초한다.
- (4) 초기시험에서 세포독성을 평가하는 것이 본시험에서 사용되는 농도를 더 잘 정의하는 데 유용할 수는 있지만 초기시험이 꼭 필요하지는 않다.
- (5) 초기 세포독성 평가가 수행되더라도 각 시험군에 대한 세포독성 측정은 여전히 본시험에서 필요하다.
- (6) 세포독성은 RS(상대 생존)를 사용하여 평가되어야 한다. 즉, 처리 직후에 깔려있는 세포의 복제효율(CE)은 음성대조군에서 조정된 복제효율과 비교하여 세포 수에 근거하며 처리 중 세포손실에 의해 조정된다(생존율 100%).
- (7) 수용성 기준(적절한 세포독성, 세포수 등)을 충족시키는 적어도 네 가지 시험농도(용매 및 양성 대조군을 포함하지 않음)에서 평가해야 한다.
- (8) 중복 배양물의 사용이 권장되는 반면, 복제 또는 단일 배양물은 시험된 각 농도에서 사용될 수 있다.
- (9) 주어진 농도에서 독립적인 복제 배양으로 얻은 결과는 별도로 보고해야 하지만 자료 분석을 위해 합쳐질 수 있다.
- (10) 거의 세포독성을 나타내지 않는 시험물질의 경우 약 2~3배 농도간격이 일반적으로 적합하며, 세포독성이 발생하는 경우 선택된 시험 농도는 세포독성을 일으키는 농도에서 세포독성이 거의 없는 농도까지의 범위를 포함해야 한다.
- (10) 세포독성의 전체범위를 포괄하거나 농도반응관계를 상세하게 연구하기 위해 보다

조밀한 농도 간격으로 네 가지 농도 이상을 사용해야 할 수도 있다(반복실험 필요).

- (11) 단일배양을 사용하는 경우 네 가지 농도 이상의 사용이 특히 중요할 수 있다.
- (12) 최대농도가 세포독성에 근거한 경우, 가장 높은 농도는 10%~20% RS를 달성하는 것을 목표로 해야 한다.
- (13) 10% RS 이하에서만 발견되는 긍정적인 결과를 해석할 때는 주의를 기울여야 한다.
- (14) 불용성의 가장 낮은 농도 이하에서 세포독성이 없는 난용성 시험물질의 경우, 최고 농도는 시험물질 처리 후 역광현미경이나 눈으로 볼 수 있는 탁도 또는 침전을 일으켜야 한다.
- (15) 불용성의 가장 낮은 농도 이상에서 세포독성이 발생하더라도, 침전물로 인해 인위적 효과가 생길 수 있으므로 혼탁도 또는 가시적인 침전물을 생성하는 농도로 시험하는 것이 바람직하다.
- (16) 침전물을 생성하는 농도에서, 침전물이 시험의 수행을 방해하지 않도록 주의해야 하며, 실험 전에 배양액에서의 용해도를 측정하는 것이 유용할 수 있다.
- (17) 침전이나 제한된 세포독성이 관찰되지 않으면 최고 시험농도는 10 mM, 2 mg/ml 또는 2  $\mu$ l/ml 중 가장 낮은 값과 일치해야 한다.
- (18) 시험물질이 정의된 조성이 아닌 경우, 예를 들어 복잡한 반응생성물 또는 생물학적 물질(예: 알 수 없거나 다양한 조성의 화학물질(UVCBs)), 환경 추출물 등인 경우, 최고농도가 더 높아야 할 수도 있다(예: 5 mg/ml).
- (19) 충분한 세포독성의 부재는 각 성분의 농도를 증가시킬 수 있지만, 이러한 필요사항은 화학물질에 따라 다를 수 있다.

## 5.8 대조군

- (1) 용매만으로 구성되고 처리 배양과 동일한 방식으로 처리되는 동시 음성대조군은 모든 실험조건에 포함되어야 한다.
- (2) 적용되는 시험조건 하에서 돌연변이원을 확인하는 시험실의 능력과, 적용가능한 경우 외인성 대사활성화계의 효과를 입증하기 위한 동시 양성대조군이 필요하다.
- (3) 양성대조군의 예를 <표 1>에 제시했으며, 타당한 경우 다른 양성대조물질을 사용할 수 있다.
- (4) 유전독성에 대한 시험관 내 포유류 세포 시험은 충분히 표준화되어 있으므로, 외인성 대사활성화 존재/부존재를 사용한 시험은 대사활성화가 필요한 양성대조군만을 사용하여 수행될 수 있다.
- (5) 이 경우 이 단일 양성대조군 반응은 대사활성화계의 활동과 시험계의 반응성을 모두 보여준다.
- (6) 각각의 양성대조군은 시험계의 민감도를 입증하기 위해 재현가능하고 검출가능한 증가를 나타낼 것으로 기대되는 하나 이상의 농도에서 사용해야 한다.

<표 1> 실험실 숙련도 평가 및 양성 대조군 선택에 권장되는 기준 물질

대사활성화 조건	(유전자) 부위	물질(CAS 번호)
외인성 대사활성화의 부재	Hprt	Ethylmethanesulfonate [CAS no. 62-50-0] Ethylnitrosourea [CAS no. 759-73-9] 4-Nitroquinoline 1-oxide [CAS no. 56-57-5]
	Xprt	Streptonigrin [CAS no. 3930-19-6] Mitomycin C [CAS no. 50-07-7]
외인성 대사활성화의 존재	Hprt	3-Methylcholanthrene [CAS no. 56-49-5] 7,12-Dimethylbenzanthracene [CAS no. 57-97-6] Benzo[a]pyrene [CAS no. 50-32-8]
	Xprt	Benzo[a]pyrene [CAS no. 50-32-8]

## 5.9 시험물질 처리

- (1) 증식하는 세포는 대사활성화계의 존재 또는 부재 시 시험물질로 처리되며, 노출 시간은 적절해야 한다(보통 3~6시간이 적당).
- (2) 시험의 각 단계에서 각 시험(대조군 및 처리군) 배양에 사용된 최소 세포 수는 자발적 돌연변이 빈도에 근거해야 한다.
- (3) 자발적 돌연변이 빈도는 일반적으로  $5 \times 10^{-6} \sim 20 \times 10^{-6}$  사이이다.
- (4) 자발적 돌연변이 빈도가  $5 \times 10^{-6}$ 이고, 처리 중 90%의 세포독성(10% RS)을 유발하는 농도로 처리된 배양에서도 자발적인 돌연변이를 충분히 유지하려면 적어도  $20 \times 10^6$  세포에 처리되어야 한다.
- (5) 충분한 수의 세포(2백만 개 미만)가 발현기간 동안 배양되어야하고 돌연변이체 선택을 위해 배양되어야 한다.

## 5.10 표현형 발현 시간 및 돌연변이 측정 빈도

- (1) 처리기간 후, 세포를 배양하여 돌연변이 표현형의 발현을 일으키며, 새롭게 유도된 Hprt 및 Xprt 돌연변이체의 최적 표현형 발현을 위해서는 일반적으로 최소 7일에서 9일이면 충분하다.
- (2) 이 기간 동안 세포는 기하급수적인 성장을 유지하기 위해 정기적으로 계대배양 한다.
- (3) 표현형 발현 후 세포는 선택제(6-thioguanine)의 유무에 따라 배지에서 재조합되어 돌연변이의 수를 측정하고 복제 효율을 측정한다.
- (4) 이 플레이트는 단층배양을 위한 페트리디쉬 또는 현탁액의 세포를 위한 마이크로 웰 플레이트를 사용하여 수행할 수 있다.
- (5) 플레이트는 최적의 콜로니 성장(예를 들어, 7~12일) 및 콜로니 계산을 위해 적절한

시간 동안 배양해야 한다.

- (6) 돌연변이 빈도는 돌연변이체 선택 시 복제 효율에 의해 보정된 돌연변이 콜로니의 수에 기초하여 계산된다.

#### 5.11 실험실 숙련도

- (1) 일상적인 시험에 사용하기 전에 시험에 대한 충분한 경험을 쌓기 위해서 시험실은 다른 기전을 통해 작용하는 표준양성대조물질(<표 1>의 물질들로 대사활성인 것과 아닌 것 중 하나 이상) 및 다양한 음성대조군(다양한 용매/운반제 사용)을 사용하여 일련의 시험을 수행해야 한다.
- (2) 이러한 양성 및 음성대조 반응은 문헌과 일치해야 한다.
- (3) 돌연변이 유발물질의 검출능력을 검증, 대사활성화계의 유효성을 결정하고, 대사증진 물질의 활성을 검증하기 위해, 대사활성의 유무에 관계없이 양성대조물질(표 1)의 선택을 조사해야 한다.
- (4) 표현형 및 돌연변이체 선택 및 채점 절차의 적합성에 대한 정보를 제공한다.
- (5) 선택된 물질의 농도범위는 시험계의 민감도와 동적 범위를 입증하기 위해 재현가능하고 농도와 관련된 증가를 줄 수 있도록 선택되어야 한다.

#### 5.12 과거의 시험 결과

- (1) 시험실은 다음을 확립해야 한다.
- 과거 시험에서 양성의 범위와 분포
  - 과거 시험에서 음성(처리되지 않은 용제)의 범위와 분포
- (2) 과거 시험에서 음성대조군 분포에 대한 자료를 처음 획득할 때, 동시 음성대조는 발표된 대조군 자료와 일치해야 한다.

- (3) 보다 많은 시험자료가 대조군 분포에 추가되면, 동시 대조군은 이상적으로는 그 분포의 95% 관리한계 내에 있어야 한다.
- (4) 시험실의 과거 음성대조 자료는 최소한 10회 실험 이상으로 구축해야 하지만, 비교 가능한 시험조건 하에서 최소 20회의 시험으로 구성하는 것이 바람직하다.
- (5) 시험실은 제어차트(예: Cchart 또는 X-bar 차트)와 같은 품질관리 방법을 사용하여 양수 및 음수 제어 데이터의 변동성을 파악하고 해당 방법이 시험실에서 '통제가능함'을 보여야 한다.
- (6) 이력 데이터를 작성하고 사용하는 방법에 대한 자세한 권장사항(즉, 과거 데이터의 포함 여부, 제외기준 및 주어진 시험의 수용기준)은 문헌에서 찾을 수 있다.
- (7) 음성대조군 자료는 단일 또는 바람직하게 복제된 복수의 배양물의 돌연변이 빈도로 구성되어야 한다.
- (8) 동시 음성대조는 이상적으로 시험실의 과거 음성대조 자료 분포의 95% 통제한계 내에 있어야 한다.
- (9) 병행된 음성대조 자료가 95% 통제한계를 벗어나는 경우, 자료가 극단적인 이상치가 아니며, 시험계가 '통제가능함'의 증거가 있다면 과거 통제 분포에 포함시키는 것이 허용될 수 있다.
- (10) 시험 지침의 모든 변경은 시험실의 기존의 통제된 자료와의 일관성을 유지해야 하며, 모든 주요한 불일치는 기존 구축된 통제 자료 내에서 결정해야 한다.

## 6. 결과 계산

### 6.1 결과의 표시

- (1) 결과의 제시는 세포독성(RS로 표현)을 계산하는데 필요한 모든 자료를 포함해야 한다.



- (2) 처리 및 대조 배양 모두에 대한 자료는 처리종료 시의 세포수, 처리 직후에 깔려있는 세포 수 및 콜로니 계수(또는 마이크로 웰 방법에서는 콜로니가 없는 웰의 수)를 포함해야 한다.
- (3) 각 배양물에 대한 RS는 동시 용매대조에 대한 백분율로 표시되어야 한다.
- (4) 결과의 제시는 또한 돌연변이 빈도를 계산하는 데 필요한 모든 자료를 포함해야 한다.
- (5) 처리된 배양액과 대조 배양액에 대한 자료는 다음을 포함해야 한다.
- ① 세포의 돌연변이 선별을 위해 배양되는 세포의 수
  - ② 플레이트로부터 계산된 콜로니 수(또는 마이크로웰 방법에서는 콜로니가 없는 웰의 수)
    - 돌연변이 빈도는(선택적 약제가 없는 플레이트에서) 복제 효율에 의해 보정된 돌연변이 콜로니 수(선택 약제가 있는 플레이트에서)를 기준으로 계산된다.
    - 돌연변이 빈도는 백만 개의 생존 가능한 세포 당 돌연변이 세포의 수로 표현되어야 한다.
- (6) 개별 배양자료가 제공되어야 하며, 모든 데이터는 표 형식으로 요약되어야 한다.

## 6.2 수용 기준

시험 합격 여부는 다음 기준에 따른다.

- (1) 동시 양성대조군은 시험실 과거 음성대조군 데이터베이스에 추가할 때 수용가능하다.
- (2) 동시 양성대조군은 과거의 양성대조군 데이터베이스에서 생성된 것과 양립할 수 있는 반응을 유도해야 하며, 동시 음성대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 증

가를 가져야 한다.

(3) 두 가지 시험조건(즉, 대사활성화가 있는 경우와 없는 경우)에서 양성 결과를 가져오지 않는 한 시험해야 한다.

(4) 적절한 세포 수와 농도가 분석가능하다.

(5) 최고농도의 선택기준은 위에서 설명한 것과 일치한다.

### 6.3 결과 평가 및 해석

(1) 모든 수용성 기준이 충족되었다면 시험물질은 검사된 모든 시험조건에서 명확하게 양성으로 간주된다.

(가) 시험농도 중 적어도 하나는 동시 음성대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 증가를 나타낸다.

(나) 증가추세는 적절한 추세 시험으로 평가할 때 농도와 관련이 있다.

(다) 결과 중 임의의 결과가 역사적인 음성대조 자료(푸아송 기반의 95% 통제한 계)의 분포 밖에 있다.

(2) 이러한 모든 기준이 충족되면 시험물질은 이 시험계에서 배양된 포유동물 세포에서 유전자 돌연변이를 유도할 수 있는 것으로 간주된다.

(3) 가장 적절한 통계방법에 대한 권장사항은 문헌에서 찾을 수 있다.

(4) 모든 허용기준이 충족된다면 시험물질은 시험된 모든 시험조건에서 명확하게 음성으로 간주된다.

(가) 시험농도 중 어느 것도 동시 음성대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 증가를 나타내지 않고,

- (나) 적절한 추세시험으로 평가할 때 농도와 관련된 증가가 없으며,
- (다) 모든 결과는 과거 음성대조 데이터(예: 푸아송 기반 95% 통제한계)의 분포에 포함된다.
- (4) 시험물질은 이 시험계에서 배양된 포유동물 세포에서 유전자 돌연변이를 유도할 수 없는 것으로 간주된다.
- (5) 명백하게 양성이거나 음성인 반응을 검증할 필요는 없다.
- (6) 위에서와 같이 반응이 명확하게 음성도 아니고 명백하게 양성도 아닌 경우 또는 결과의 생물학적 타당성을 확인하는 데 도움이 되는 경우 전문가의 판단 또는 추가조사를 통해 데이터를 평가해야 한다.
- (7) 수정된 시험조건(예: 농도 간격, 다른 대사활성화 조건(즉, S9 농도 또는 S9 출처)을 사용하여 반복시험을 수행하는 것이 유용할 수 있다.
- (8) 드문 경우이지만, 추가조사 후에도 양성 또는 음성 결과의 결론을 내리지 못하는 경우는 모호하게(양성 또는 음성(의양성)으로 동등하게 해석될 수 있음) 결론 지을 수 있다.

## 7. 시험결과의 보고

7.1 시험보고서에는 다음 정보가 포함되어야 한다.

- (가) 시험물질의 출처, 로트 번호, 시험물질 사용기한
- (나) 시험물질의 안정성
- (다) 용매에서의 시험물질의 용해도 및 안정성(알려진 경우)
- (라) 시험물질이 첨가된 배양 배지에서 pH, 삼투압 및 침전물의 측정

## 7.2 시험보고서

### (1) 단일 구성 물질 :

(가) 물리적인 외관, 수용성 및 추가적인 물리화학적 특성

(나) IUPAC 또는 CAS명, CAS 번호, SMILES 또는 InChI 코드, 구조식, 순도, 적절하고 실질적으로 실현가능한 불순물의 화학적 동일성 등과 같은 화학적 식별

### (2) 다 성분 물질, UVCB 및 혼합물

(가) 화학적 동일성, 성분의 정량적 발생 및 관련 물리화학적 성질에 의해 가능한 특징

### (3) 용제

(가) 용제 선택에 대한 타당성

(나) 최종 배양배지에서 용매의 백분율

### (4) 세포

(가) 시험실 마스터 세포 배양

(나) 유형, 세포주의 근원

(다) 가능한 경우 통행의 횟수 및 시험실 내 기록

(라) 염색체의 핵형 특징 및/또는 염색체수

(마) 세포배양의 유지를 위한 방법

(바) 마이코플라스마 부재

(사) 세포 배증 시간

(5) 시험조건

(가) 세포독성 데이터 및 용해도 제한 등을 포함하는 농도 및 배양 수의 선택에 대한 이론적 근거

(나) 배지 구성, CO<sub>2</sub> 농도, 습도 수준

(다) 배양 배지의 최종농도(예: 배양 배지의  $\mu\text{g}$  또는  $\text{mg/ml}$  또는  $\text{mM}$ )로 표시되는 시험물질의 농도

(라) 배양 배지에 첨가된 용매 및 시험물질의 농도(및/또는 용적)

(마) 배양 온도

(바) 잠복기

(사) 처리 기간

(아) 처리 중 세포 밀도

(자) 대사활성화계(S9의 공급원, S9 혼합물의 제조 방법, 최종 배양배지에서의 S9 mix 및 S9의 농도 또는 부피, S9의 품질 관리)의 유형 및 조성

(차) 양성 및 음성대조물질, 각 처리조건에 대한 최종농도

(카) 발현 기간(배양한 세포의 수 및 경우에 따라 하위배양과 영양물을 주는 날의 수 포함)

(타) 선택적 약제 및 그 농도의 동일성

(과) 시험의 수용가능성 기준

(하) 생존 가능한 세포와 돌연변이 된 세포의 수를 나열하는 데 사용되는 방법

(거) 세포독성의 측정에 사용되는 방법

(너) 사용한 세포독성 및 방법과 관련된 보충 정보

(더) 세포를 깔은 후 항온처리 시간

(러) 시험의 양성, 음성 또는 의양성으로 간주하기 위한 기준

(머) pH, 삼투압 및 침전 세포수를 결정하는 데 사용되는 방법

## (2) 결과

(가) 처리된 세포의 수 및 각 배양물에 대해 계대배양 된 세포의 수

(나) 세포독성 측정 및 기타 관찰(있는 경우)

(다) 침강의 징조와 결정시간

(라) 선택 및 비선택 배양액에 도달된 세포의 수

(마) 선택 배지와 비선택적 배지에서의 콜로니 수 및 선택배지에서의 저항성 콜로니 수 및 관련된 돌연변이 빈도

(바) 가능한 경우 농도-반응 관계

(사) 동시 음성(용매) 및 양성대조 자료(농도 및 용매)

(아) 범위, 평균, 표준편차 및 신뢰 구간(예: 95%) 및 데이터 수와 함께 과거 음성(용매) 및 양성대조 자료

(자) 통계분석(개별 배양 및 적절한 경우 복제물에 대한) 및 p-값(있는 경우)

(6) 결과에 대한 토의

(7) 결론

## <부록 1> 세포독성 및 변이원성 평가를 위한 공식

세포독성은 상대생존율(RS)에 의해 평가된다. 즉, 처리 직후에 깔려있는 세포의 복제 효율(CE)은 음성대조군(100%의 생존을 나타냄)에서 조정된 복제 효율과 비교하여 처리 동안 세포의 손실에 의해 조정된다(아래의 RS 공식 참조).

시험물질로 처리된 배양물에 대한 보정된 CE는 다음과 같이 계산한다.

$$\text{보정된 CE} = \text{CE} \times \frac{\text{처리 종료 시 세포의 수}}{\text{처리 개시 시 세포의 수}}$$

시험물질에 의해 처리된 배양물에 대한 RS는 다음과 같이 계산한다.

$$\text{RS} = \frac{\text{처리 배지에서 보정된 CE}}{\text{용매대조군에서 보정된 CE}} \times 100$$

돌연변이 빈도는 선택 배지에서의 돌연변이 콜로니의 복제 효율 선택 시 동일한 배양물에서 측정된 비선택적 배지에서의 복제효율로 나눈 값이다.

$$\text{돌연변이 빈도} = \frac{\text{선택 배지에서의 돌연변이 콜로니의 복제효율}}{\text{비선택적 배지에서의 복제효율}}$$

플레이트를 복제 효율성을 위해 사용할 때:

$$\text{CE} = \text{콜로니 수} / \text{깔아놓은 세포의 수}$$

복제 효율을 위해 마이크로 웰 플레이트를 사용하는 경우:

마이크로 웰의 웰당 콜로니 수는 푸아송 분포를 따른다.

$$\text{복제 효율} = -\text{Ln}P(0) / \text{웰 당 깔려있는 세포의 수}$$

여기서  $-\text{Ln} P(0)$ 은 존재하는 웰에서 유래된 빈 웰의 가능한 수이며 다음 공식에 의해 설명된다.

$$\text{Ln}P(0) = -\text{Ln}(\text{빈 웰의 수} / \text{존재하는 웰의 수})$$