

KOSHA GUIDE

T - 7 - 2020

화학물질의 시험관내 포유류 세포
소핵시험 지침

2020. 12.

한국산업안전보건공단

안전보건기술지침의 개요

- 작성자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 김 수 진
- 개정자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 임 경 택
- 제·개정 경과
 - 2013년 11월 산업독성분야 제정위원회 심의
 - 2017년 9월 산업독성분야 제정위원회 심의(개정)
 - 2020년 12월 산업독성분야 제정위원회 심의(개정)
- 관련규격 및 자료
 - 국립환경과학원고시(화학물질의 시험방법에 관한 규정)
 - “*In vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test”, OECD Guideline for the testing of chemicals. TG487, Adopted 29 July 2016.
- 관련법규, 규칙, 고시 등
 - 산업안전보건법 제105조(유해인자의 유해성·위험성 평가 및 관리 등), 제108조(신규화학물질의 유해성·위험성 조사), 제110조(물질안전보건자료의 작성 및 제출), 114조(물질안전보건자료의 게시 및 교육)
 - 산업안전보건법 시행규칙 제141조(유해인자의 분류기준), 제143조(유해인자의 관리 등)
 - 고용노동부 고시(화학물질의 분류·표시 및 물질안전보건자료에 관한 기준)
 - 국립환경과학원 고시(화학물질의 시험방법에 관한 규정)
- 기술지침의 적용 및 문의
 - 이 기술지침에 대한 의견 또는 문의는 한국산업안전보건공단 홈페이지(www.kosha.or.kr)의 안전보건기술지침 소관분야별 문의처 안내를 참고하시기 바랍니다.
 - 동 지침 내에서 인용된 관련규격 및 자료, 법규 등에 관하여 최근 개정본이 있을 경우에는 해당 개정본의 내용을 참고하시기 바랍니다.

공표일자 : 2020년 12월

제 정 자 : 한국산업안전보건공단 이사장

화학물질의 시험관내 포유류 세포 소핵시험 지침

1. 목적

이 지침은 『산업안전보건법』 제105조(유해인자의 유해성·위험성 평가 및 관리 등), 제108조(신규화학물질의 유해성·위험성 조사), 제110조(물질안전보건자료의 작성 및 제출), 114조(물질안전보건자료의 게시 및 교육) 등 화학물질 취급에 따른 노출에 의해 일어날 가능성이 있는 건강장해에 관한 정보를 제공하기 위한 유전독성시험법으로서 유전독성에 대한 시험을 통해 유전독성이 있는 화학물질 또는 혼합물의 특성을 평가하기 위한 시험관내 포유류 세포 소핵시험 지침을 제시하고자 한다.

2. 적용범위

이 지침은 법과 관련하여 화학물질의 노출에 의한 건강장해에 관한 자료제공을 위한 시험관내 포유류 세포 소핵시험법에 적용한다.

3. 용어의 정의

3.1 이 지침에서 사용하는 용어의 정의는 다음과 같다.

3.1.1 “이수체 유발원(Aneugen)” 라 함은 체세포 분열 주기와 생식세포 분열 주기의 구성요소와 상호작용함으로써 세포나 개체에서 이수성을 유도하는 어떤 물질 또는 과정을 말한다.

3.1.2 “염색체 이수성(Aneuploidy)” 이라 함은 염색체 전 세트(배수성)가 아니라 한 개 또는 한 개 이상의 염색체에 의하여 생성되는 정상 이배체(또는 반수체) 수의 염색체와의 편차를 말한다.

3.1.3 “세포자멸사(Apoptosis)” 라 함은 막으로 둘러싸인 입자들에 의해 세포의 분해가 유도되고 그때 식세포 작용이나 나눠짐으로써 제거되는, 일련의 단계에 의해 특징지어지는 계획된 세포사멸을 말한다.

- 3.1.4 “동원체”라 함은 염색분체가 모여있고, 키네토코어가 측면에 붙어있는 염색체 하나의 DNA 부분을 말한다.
- 3.1.5 “염색체이상 유발물질(Clastogen)”이라 함은 세포 군집 또는 개체 내에서 구조적인 염색체 이상을 야기하는 어떤 물질 또는 과정을 말한다.
- 3.1.6 “세포질분열”이라 함은 각각 1개의 핵을 포함하는 2개의 딸세포를 형성하기 위해 유사 분열 직후에 일어나는 세포 분열의 과정을 말한다.
- 3.1.7 “세포질분열억제 증식지수(CBPI, Cytokinesis-Block Proliferation index)”라 함은 처리 안한 대조군과 상대적으로 비교하여 처리한 군에서 2차 분열 세포의 비율을 말한다.
- 3.1.8 “성장억제(Cytostasis)”라 함은 세포 성장의 억제를 말한다.
- 3.1.9 “세포독성”이라 함은 궁극적으로 세포 죽음을 야기하는, 세포 구조 또는 기능에 유해한 효과들을 말한다.
- 3.1.10 “유전독성”이라 함은 절단, 부가물 재배치, 돌연변이, 염색체이상, 이수성을 포함한 모든 유형의 DNA 또는 염색체 손상을 아우르는 일반적인 용어이며 모든 유형의 유전독성 영향들이 돌연변이나 안정된 염색체 손상을 야기하는 것은 아니다.
- 3.1.11 “간기 세포”라 함은 체세포분열 단계에 있지 않은 세포들을 말한다.
- 3.1.12 “키네토코어(Kinetochores)”라 함은 세포 분열 동안 딸세포의 극으로 딸 염색체들의 질서정연하게 이동하는 것을 허락하면서, 방추사가 연결되는, 한 염색체의 동원체에서 조립되는 단백질을 포함하는 구조를 말한다.
- 3.1.13 “소핵”이라 함은 체세포분열의 말기 또는 생식세포분열 동안 전체 염색체 또는 뒤떨어진 염색체 조각들에 의해 생성되는, 세포의 주핵과 분리된 추가적인 작은 핵을 말한다.
- 3.1.14 “유사분열”이라 함은 전기, 전중기, 중기, 후기, 말기로 구분되는 세포 핵의 분열을 말한다.

- 3.1.15 “유사분열지수(Mitotic index)” 라 함은 세포 군집에서 관찰되는 세포 총 수에 의해 나뉘지는 세포분열 중기에 있는 세포의 비율(그 군집의 세포 증식 정도의 지표)을 말한다.
- 3.1.16 “변이원성(Mutagenic)” 이라 함은 유전자들 내에서 DNA 염기쌍 서열 또는 염색체 구조에서 (염색체이상) 의 유전 가능한 변화를 생성함을 말한다.
- 3.1.17 “비분리(Non-disjunction)” 라 함은 쌍을 이룬 염색분체가 떨어져, 발생하는 딸세포로 적절히 분리하는데 실패, 비정상적인 수의 염색체를 갖는 딸세포들을 야기함을 말한다.
- 3.1.18 “배수체(Polyploidy)” 라 함은 개개의 염색체 또는 염색체들과 반대되는 것으로써(이수성), 전체 세트의 염색체와 관련된 세포 또는 개체에서 수적 염색체 이상을 말한다.
- 3.1.19 “증식지수(PI, Proliferation Index)” , “세포계수시 상대증가(RICC, Relative Increase in Cell Count)” , “상대군집배가(RPD, Relative Population Doubling)” 는 사이토칼라신 B가 사용되지 않을 때 세포독성 측정 방법이다.
- 3.1.20 “복제지수 (RI, Replication Index)” 라 함은 처리 기간 및 회복 동안, 미처리 대조군에 상대적으로, 처리군에서 완료된 세포 분열 주기의 비율을 의미한다.

4. 시험관내 포유류 세포 소핵시험법 배경

- 4.1 시험관내 포유류 세포 소핵시험은 세포분열 단계 중 간기에 있는 세포의 세포질 내 소핵 유무를 조사하기 위한 유전독성시험법이다. 소핵은 동원체가 없는 염색체 조각 또는 세포분열 단계 중 후기 동안 양극으로 이동할 수 없는 전염색체에서 생성된다. 본 시험법은 시험물질 처리 동안 또는 처리 후에 세포분열에 들어간 세포들에서 염색체이상 유발물질 또는 이수체 유발원으로 작용하는 화학물질을 선별한다. 본 시험 지침은 액틴 중합 억제제인 사이토칼라신 B(cytoB)를 사용하는 시험법과 사용하지 않는 시험법 모두를 채택한다. 표적화된 체세포분열 단계 전에 사이토칼라신 B가 추가되면, 2개의 핵을 갖기 때문에 한번 세포분열을 완료한 세포가 확인가능하고, 소핵빈도의 선택적인 분석이 가능하다. 본 시험 지침은 또한 분석되

는 세포군이 체세포분열을 수행했다는 증거가 입증된다면, 세포질분열 억제를 하지 않는 시험법을 채택한다.

- 4.2 소핵 유발 화학물질을 확인하고자 시험관내 포유류 세포 소핵시험을 수행하는데 추가하여, 세포질분열 억제, 키네토코어 면역화학적 표지, 동원체/염색체말단소립 탐침으로 형광성 원위치 하이브리디제이션(FISH)를 이용하는 것은 또한 염색체 손상 및 소핵 형성 기전 정보를 제공할 수 있다. 소핵 형성이 증가되고, 그 증가가 염색체이상 유발물질 그리고/또는 이수체 유발원에 의한 것인지 연구자가 결정하고자 할 때 표지와 하이브리디제이션 방법이 사용될 수 있다.
- 4.3 세포분열 중기 단계의 세포에서 계수되는 염색체 이상은 유전되지 않을 수도 있는 반면, 소핵은 딸세포로 유전되는 손상을 나타낸다. 세포분열 간기 단계의 세포에서 소핵은 상대적으로 객관적으로 평가될 수 있기 때문에, 연구자는 세포분열이 진행되고 있는가와 얼마나 많은 세포들이 소핵을 포함하고 있는가를 결정할 필요가 있다. 그 결과, 시료는 상대적으로 빨리 계수되고, 분석은 자동화될 수 있다. 이러한 점은 시험을 강력하게 만들며, 처리군 당 수백 개의 세포가 아닌 수천 개를 계수하는 것을 가능하게 한다. 마지막으로, 소핵은 동떨어진 염색체에서 발생될지도 모르기 때문에, OECD 473번 시험 가이드라인처럼 기존의 염색체이상시험에서 연구에서 연구하기 어려운 이수성을 유도하는 물질을 선별할 수 있다. 그러나, 시험관내 포유류 세포 소핵시험법은 4.2항에서 기술된 FISH 같은 특정 기술 없이, 그러한 염색체이상 유발물질과 배수성을 유도하는 화학물질을 구별할 수 없다.
- 4.4 시험관내 포유류 세포 소핵시험은 전형적으로 사람 또는 설치류 배양 세포를 이용하는 시험관내 시험법이다. 이수체 유발원과 염색체이상 유발물질 둘 다를 선별할 수 있기 때문에, 시험관내에서 염색체 손상 가능성을 조사하기 위한 포괄적이고 종합적인 근거를 제시한다.
- 4.5 시험관내 포유류 세포 소핵시험은 다양한 유형의 세포에서, 사이토칼라신 B의 존재 또는 부재 하에 강력하고 효과적인 시험법이다. 다양한 설치류 세포주 (CHO, V79, CHL/IU, L5178Y)와 사람 림프구를 이용, 시험관내 포유류 세포 소핵시험의 타당성을 지지하는 광범위한 데이터가 있다. 이에 특히 프랑스 유전독성학회에 의해 결성된 국제 타당성 연구와 유전독성시험 국제 워크숍 보고서가 포함된다. 활용 가능한 데이터는 또한 유럽연합집행기관(EC)의 유럽대체시험법 검증센터(ECVAM)에 의하여 증거비중 소급적용되는 타당성 연구에서 재평가되었으며, 시험법은 ECVAM 과학자문위원회(ESAC)에서 과학적으로 입증되었을 때 지지되어왔다. 비

록 타당성 연구에서 사용되지 않았음에도 불구하고, 사람 TK6 림프아구성 세포주, HepG2 세포, 초대 시리아 햄스터 배아세포의 사용이 기술되어왔다.

4.6 사용한 정의는 별첨 1에 수록되어있다.

5. 초기 고려사항

5.1 일반적으로 생체 외에서 수행되는 시험에서, 세포가 시험물질을 충분히 대사하지 못한다면, 대사활성화를 시킬 수 있는 외부 공급원을 사용하여야 한다. 외인성 대사활성계는 생체 내 조건 전부를 모방할 수 없으며, 또한 본질적인 변이원성을 반영하지 않는, 인위적 양성 결과를 도출할 조건들을 피하기 위하여 주의하여야 한다. 이는 pH, 오스몰농도의 변화 또는 세포독성이 크면 발생가능하다. 시험물질 첨가 시점에 배양액 pH가 변한다면, 농축용액을 완충함으로써 pH가 보정되어야 한다. 시험군과 대조군은 가급적 모두 부피가 같게 유지되어야 한다.

5.2 소핵 유발을 분석하기 위해서, 처리군과 미처리군 둘 다에서 체세포분열이 일어나는 것이 필수적이다. 소핵 계수에 가장 유용한 정보를 주는 단계는 시험물질 처리 동안 또는 시험물질 처리 후 체세포분열이 1회 완료된 세포에서이다.

6. 시험 원리

6.1 세포가 적절한 대사 능력을 갖고 있지 않다면, 사람 또는 포유류 기원의 배양 세포에 (외인성 대사활성원과 시험물질을 함께), (외인성 대사활성원 없이 시험물질만) 노출시키고, 용매/부형제와 양성대조물질이 시험 시 모두 포함되어야 한다.

6.2 시험물질 처리 동안 또는 후에, 세포는 세포분열 간기의 세포에서 소핵 형성을 유발하는 염색체 또는 방추사 손상을 허락할 만큼 충분한 기간 동안 자란다. 이수성의 유발을 위하여, 시험물질은 대개 체세포 분열동안 존재해야 하며, 수거하여 염색한 세포분열 간기의 세포들은 소핵 유발에 대해 분석된다. 이상적으로, 소핵은 오로지 시험물질의 처리동안 또는 처리 후 기간 동안 체세포분열을 완료한 세포에서 계수되어야 한다. 이는 세포질분열 억제제를 처리한 군에서, 이핵 세포만을 계수함으로써 가능하다. 세포질분열 억제제의 부재 시, 분석된 세포가 시험물질 처리 동안 또는 처리 후에 세포 분열을 수행하였음을 입증하는 것이 중요하다. 모든 시

험법에서, 대조군과 처리군 모두에서 세포 증식이 일어남을 입증하는 것이 중요하다. 소핵을 계수하는 군에서, 시험물질에 의해 유도된 세포독성 또는 세포증식 억제제의 범위가 평가되어야 한다.

7. 시험방법의 기술

7.1 시료준비

- (1) 사람 말초혈 림프구 초대배양세포와 CHO, V79, CHL/IU, L5178Y 같은 많은 설치류 세포주가 사용된다. 다른 세포주와 세포 유형의 사용은 수용 기준 항에서 기술된 것처럼, 시험에서 입증된 성능에 기반하여 정당화되어야 한다. 소핵 배경 빈도가 시험 감수성에 영향을 줄 것이기 때문에, 낮고 안정된 소핵형성 배경 빈도를 갖는 세포유형이 사용되는 것이 권고된다.
- (2) 사람 말초혈 림프구는 최근에 유전독성을 일으키는 화학물질이나 방사선에 노출되지 않은, 젊고(대략 18-35세), 건강한, 비흡연자에게서 채혈하여 얻는다. 세포 사용을 위해 1명 이상의 기증자로부터 모았다면, 기증자 수가 구체적으로 명시되어야 한다. 소핵 빈도는 나이에 따라 증가하며, 이러한 경향은 남성보다 여성에서 더 뚜렷하기 때문에 기증자 세포의 선택 시 이러한 사항이 고려되어야 한다.

7.1.1 배양액과 배양조건

- (1) 적합한 배양액과 배양조건(배양용기, CO₂ 농도, 온도, 습도)이 배양을 유지하는데 사용되어야 한다. 염색체수 최빈값(형식적 염색체수)의 안정성과 마이코플라스마 오염 부재에 대하여, 잘 정립된 세포주와 계통이 일상적으로 점검되어야 한다. 형식적 염색체수가 변하거나 오염되었다면 사용되어서는 안된다. 시험이 실시되는 실험실에서 사용되는 배양 조건에 대한 정상적인 세포 주기 시간이 알려져 있어야 한다. 세포질분열-억제 방법이 사용된다면, 특정 세포 유형에 대해 세포질분열 억제제의 농도가 최적화되어있어야 하며, 계수하기에 좋은 수득률의 이핵 세포를 생성하는 것으로 보여야 한다.

7.1.2 배양 준비

- (1) 확립된 세포주 및 계통 : 저장되었던 세포를 풀어서 증식시키고, 배양액에서 회수

하는 시점 전까지 과밀하지 않도록 37°C에서 배양한다.

- (2) 림프구 : 시험물질과 사이토칼라신 B 처리 전에, 헤파린 같은 항응고제로 처리된 전혈, 또는 분리된 림프구가 피토헤마글루티닌 (PHA) 같은 미토겐(유사분열촉진 물질)의 존재하에 배양된다.

7.1.3 대사 활성화

- (1) 불충분한 외인성 대사 능력을 갖는 세포를 사용할 때에는 외인성 대사계가 사용되어야 한다. 가장 일반적으로 사용되는 시스템은 조효소로 보강된, 아로클로 1254 또는 페노바비탈과 β -나프트후라본의 조합 같은 효소유도체로 처리된 설치류의 간에서 얻은, 포스트 미토콘드리아 분획(S9)이다. 후자의 조합은 잔류성 유기오염물질(POPs)에 관한 스톡홀름 협정과 모순되지 않으며, 혼합 기능 산화효소를 발생시키는데, 아로클로 1254 만큼 효과적인 것으로 알려져 있다. S9 분획은 전형적으로 배양액 내에서 1~10% (v/v) 범주의 농도에서 사용된다. 대사활성계의 조건은 시험되는 화학물질의 계통에 의존적일 것이며, 일부의 경우, 한 가지 S9 농도 이상을 활용하는 것이 타당할지도 모른다.
- (2) 특정 사람 또는 설치류 활성 효소를 발현하도록 유전적으로 조작된 세포주는 외인성 대사활성계에 대한 필요성이 제거되어, 시험용 세포로 사용될 수 있다. 그러한 경우에, 사용되는 세포주의 선택이 시험물질의 대사에 대한 혼합 기능 산화효소제의 타당성과 알려진 염색체이상 유발물질과 이수체 유발원에의 반응성에 대해 과학적으로 정당화 되어야 한다. 시험되는 물질이 발현되는 혼합 기능 산화효소에 의해 대사되지 않을 수도 있음이 인식되어야 하며, 이런 경우에, 음성 결과는 시험물질이 소핵을 유발하지 않음을 시사하지 않는다.

7.1.4 시험물질 준비

- (1) 세포에 처리 전에 용시로 고상의 시험물질은 적합한 용매 또는 부형제에서 용해되고, 희석되어야 한다. 액상 시험물질은 시험계에 직접 또는 처리 전에 희석되어 첨가될 수 있다. 가스상 또는 휘발성 물질은 밀봉된 용기에서 처리하는 것처럼, 표준 프로토콜을 적합하게 변경하여 시험해야 한다. 저장 용인성을 입증하는 안정성 데이터가 없다면 시험물질은 용시조제 되어야 한다.

7.2 시험조건

7.2.1 용매/부형제

- (1) 용매/부형제는 시험물질과 반응해서는 안되며, 세포의 생존 또는 사용되는 농도에 서 S9 활성의 유지와 양립할 수 없어서는 안된다. 잘 정립된 용매/부형제(즉, 물, 세포배양액, dimethyl sulfoxide (DMSO))가 아닌 다른 물질이 사용된다면, 유전 독성이 없고, 시험물질과의 양립 가능성을 제시하는 자료에 의해 사용이 지지되어야 한다. 가능하다면, 수용성 용매/부형제의 사용이 우선적으로 고려되어야 함이 권고된다.

7.2.2 세포질분열 억제제로서 사이토칼라신 B의 사용

- (1) 시험관내 포유류 세포 소핵시험을 수행함에 있어 가장 중요하게 고려되어야 할 사항 중 하나는 계수되는 세포가 처리 동안 또는 처리 후 배양 기간 동안 체세포 분열을 완료함을 보장하는 것이다. 사이토칼라신 B는 액틴 조립을 억제하기 때문에 세포질 분열을 억제하는데 가장 폭넓게 사용되는 물질이다. 그래서 이핵 세포의 형성을 유도하며, 체세포분열 후에 딸세포로 분리되는 것을 방해한다. 그러므로, 소핵 계수는 처리동안 또는 처리 후 체세포분열을 거친 세포로 제한될 수 있다. 세포 증식 동태학에서 시험물질의 효과가 동시에 측정될 수 있다. 사람 림프구가 사용될 때, 배양세포 내에서 또한 기증자 세포 내에서 세포 주기가 다양하며, 모든 림프구가 PHA에 반응하지 않기 때문에, 사이토칼라신 B가 세포질 분해 억제제로서 사용되어야 한다. 계수되는 세포들이 분열되는지를 결정하기 위하여 세포주를 시험할 때 다른 방법들이 사용되어 왔으며, 아래에서 그 내용을 다루도록 한다.
- (2) 용매/부형제 대조군에서 이핵 세포의 적정 빈도를 얻기 위하여, 사이토칼라신 B의 적정 농도는 각 세포 유형에 대하여 연구실에서 결정되어야 한다. 사이토칼라신 B의 적정 농도는 대개 3~6 µg/ml 이다.

7.2.3 세포증식 및 세포독성의 측정과 처리 농도의 선택

- (1) 시험물질 최고 처리 농도를 결정할 때, 과도한 세포독성, 배양액에서 침전, pH나 오스몰농도에서 뚜렷한 변화를 생성하는, 인위적 양성 반응을 생성하는 농도는 피하여야 한다.

- (2) 세포증식의 측정은 시험동안 처리된 세포가 체세포분열을 수행함과, 시험물질 처리가 세포독성의 적절한 수준에서 수행됨을 보장하도록 해야 한다. 사이토칼라신 B가 사용되지 않는다면, 세포계수시 상대증가(RICC) 또는 상대군집배가(RPD)를 사용하여 세포독성이 대사활성화를 요구하지 않는 세포에서 대사 활성화 유무와 함께 결정되어야 한다. (별첨 2의 계산식 참조) 사이토칼라신 B가 사용되었을 때, 세포독성은 복제지수(RI)을 사용하여 결정될 수 있다. (별첨 2의 계산식 참조)
- (3) 사이토칼라신 B로 처리, 배양에서 단핵, 이핵, 그리고 다핵 세포의 상대적 빈도 측정은 세포증식상의 효과와 처리의 세포독성 또는 세포증식억제 활성을 정량하는 정확한 방법을 제공한다. 그리고 처리 동안 또는 처리 후에 분열되는 세포만 계수되는 것을 보증한다.
- (4) 사이토칼라신 B를 가지고 한 시험에서, 세포증식억제/세포독성은 세포질분열억제 증식지수(CBPI)로부터 정량화 될 수 있거나, 또는 처리군당 적어도 500개 세포에서 RI로부터 유래될 지도 모른다.(별첨 2의 계산식 참조) 사이토칼라신 B가 세포증식을 평가하는데 사용될 때, CBPI 또는 RI가 적어도 처리군당 500개 세포에서 결정되어야 한다. 다른 것들 사이에 이들 측정은 처리군과 대조군에서 값을 비교함으로써 세포독성을 추정하는데 사용될 수 있다. 세포독성의 다른 표지자의 평가(즉, 세포증식의 측정, 세포수, 아포토시스, 괴사, 중기 계수)는 유용한 정보를 제공할 수 있다.
- (5) 사이토칼라신 B 없이 하는 시험에서, 배양용기에서 계수되는 세포가 시험물질 처리 동안 또는 처리에 잇따라서 세포분열을 수행하였음을 입증하는 것이 필요하다. 그렇지 않으면 위음성 반응을 생성할지도 모른다. 분열된 세포들이 계수되고 있다는 것을 입증하기 위해 사용되는 방법들은 복제된 세포들을 확인하기 위하여, 브로모데옥시우리딘(BrdU)이 결합하여 잇따라 확인되는 것, 현미경 슬라이드 상의 제자리에서 영구적인 세포주로부터의 세포가 처리되고 계수될 때 클론들의 형성(증식지수(PI)), 상대군집배가(RPD) 또는 세포계수시 상대증가(RICC)의 측정 또는 다른 입증된 방법들을 포함한다. (별첨 2의 계산식 참조) 세포독성 또는 세포성장의 억제에 대한 다른 표지자들의 평가(즉, 세포증식의 측정, 세포수, 세포자멸사(아포토시스), 괴사, 중기 계수)가 유용한 정보를 제공할 수 있다.
- (6) 적어도, 3개의 분석 가능한 시험농도가 평가되어야 한다. 이에 도달하기 위하여,

더 큰 수의 가까이 간격을 둔 농도를 사용하여 실험을 수행하고, 적합한 범주의 세포독성을 제공하는 이들 농도에서, 소핵 형성을 분석하는 것이 필요할 수 있다. 대안 전략은 최종 시험을 위한 범주를 좁히기 위하여 예비 세포독성 시험을 수행하는 것이다.

- (7) 가장 높은 농도는 $55 \pm 5\%$ 세포독성을 생성하는 것을 목표로 하여야 한다. 더 높은 농도는 세포독성의 2차 효과로서 염색체 손상을 유도할 수도 있다. 선택된 시험 농도는 세포독성이 일어난 지점을 포함시켜야 한다. 즉, $55 \pm 5\%$ 세포독성을 생성하는 농도에서 거의 또는 세포독성이 없는 농도까지 포함하여야 한다.
- (8) 세포독성이 없거나 침전이 관찰된다면, 가장 높은 시험 농도는 0.01 M, 5 mg/mL 또는 5 μ L/mL 중 하나이어야 한다. 처리 농도는 공비 10 내외의 간격을 둔다. 급격한 농도-반응 경사를 보이는 시험물질에 대하여는, 좀 더 좁은 간격을 둘 필요가 있다. 시험물질 처리 저농도군, 중농도군이 또한 계수될 것이다.
- (9) 용해성이 제한인자일 때, 세포독성에 의해 제한되지 않는다면, 최고 농도는 최소 침전이 배양에서 보이고, 계수에 간섭을 주지 않는 가장 낮은 농도이어야 한다. 광학 현미경법 같은 방법에 의해 처리의 종료시점까지 배양동안 침전물이 나타나는지 침전의 평가가 행해져야 한다.

7.2.4 대조물질

- (1) 대사활성화 유·무시 양성대조군, 용매/부형제 대조군이 실험에 포함되어야 한다.
- (2) 양성대조물질은 사용되는 세포와 시험 프로토콜의 역량을 설명하고, 염색체이상 유발물질과 이수체 유발원을 확인하고, S9 조제시약의 대사 능력을 단언하는데 필요하다. 양성대조군은 배경을 뛰어넘는 작은, 그러나 재현성 있는 증가를 주고, 시험계의 감도를 설명할 것으로 기대되는 농도에서 소핵형성의 알려진 유도자를 이용해야 한다. 양성 대조 농도는 판독자에게 슬라이드가 암호화 되어 있어 정체가 바로 드러나지는 않으나, 분명한 효과를 보이는 농도로 선택되어야 한다.
- (3) 대사 활성화를 필요로 하는 염색체이상 유발물질 (즉, 시클로포스파미드, 벤조피렌)은 대사 기능과 염색체이상 유발물질을 감지하는 시험계의 능력을 입증하기 위해 사용되어야 한다. 정당화 된다면, 다른 양성대조 물질들이 사용될 수도 있다. 대사활성화를 필요로 하는 일부 양성대조물질은 특정 처리 조건 하에서 또는 어

면 세포 주에서 외인성 대사 활성화 없이 활성화 될 수도 있기 때문에, 선택된 세포주에서 그리고 선택된 농도에서 대사 활성화에 대한 요구, S9 조제용액의 활성이 시험되어야 한다.

- (4) 현재로서, 유전독성 활성을 위해 대사 활성화를 필요로 한다고 알려진 이수체 유발원은 없다. 예를 들어, 이수체 유발원 활성화에 대해 현재 수용되는 양성 대조물질은 콜히친과 빈블라스틴이다. 이수체 유발원 활성을 통해 소핵을 단독으로 또는 1차적으로 유도한다면, 다른 물질들이 사용될 수 있다. 염색체이상 유발성과 이수체 유발성에 대한 2개의 양성 대조물질에 대한 요구를 피하기 위하여 대사 활성화 없이, 이수체 유발성 대조군이 S9 없이 양성대조군으로서 작용할 수 있다. 염색체손상유발 대조군은 사용되는 대사활성화계의 타당성을 시험하는데 사용될 수 있다. 염색체손상유발과 이수체 유발성 둘 다에 대한 양성대조물질이 S9을 필요로 하지 않는 세포에서 사용되어야 한다. 제안되는 양성대조 화학물질은 별첨 3에 포함되어 있다.
- (5) 적합한 물질이 이용가능하다면, 화학물질 군 연관된 양성대조 화학물질의 사용이 고려될 수 있다. 사용되는 모든 양성 대조 물질은 세포 유형과 활성화 조건에서 적합하여야 한다.
- (6) 용매/부형제 대조군이 모든 수거 시기에 포함되어야 한다. 추가적으로, 유전독성이 없는 또는 다른 유해한 효과가 사용되는 농도에서 선택된 용매에 의해 유도되는지를 입증하는 게재된 또는 실험실에 축적된 대조군 데이터가 없다면, 용매/부형제 미처리 음성 대조군이 또한 사용되어야 한다.

8. 절차

8.1 처리 일정

- 8.1.1 세포 주기에서 어떤 특정 단계에서 작용하는 이수체 유발원 혹은 염색체이상 유발물질을 감지하는 확률을 극대화하기 위하여, 세포주기 전체 단계 동안에 충분한 수의 세포가 시험물질로 처리되는 것이 중요하다. 그러므로, 세포주와 초대 배양세포의 처리 일정은 세포주기를 개시하기 위하여 유사분열 촉진물질 자극을 필요로 하는 림프구의 처리 일정과 다소 다르며, 이 내용은 41~43항에서 다룬다.

- 8.1.2 게재된 데이터와 함께 이론적인 고려사항들은 S9의 존재와 부재 하에서, 3~6 시간 단기간 처리 후 잇따라 시험물질을 제거하고, 1.5~2.0 세포주기 동안 증식시킴으로 인해 대부분의 이수체 유발원과 염색체이상 유발물질이 확인될 것이라는 것을 보여준다. 처리 시작 후나 처리 끝 둘 중 하나에서 정상 (즉, 처리되지 않은) 세포 주기 길이 약 1.5~2.0 배 까지 동등한 시간에 세포는 수거된다(표1). 시험 물질이 세포 주기 시간에 영향을 주는 것으로 알려져 있거나 의심된다면(즉, 뉴클레오시드 유사체가 시험될 때) 수거 및 회복 시간은 연장될 수 있다.
- 8.1.3 포유류 배양세포에 대하여 S9 조제용 물질의 잠재적인 독성 때문에, 1.5~2.0 정상 세포 주기의 연장된 노출 처리는 오직 S9의 부재에서 사용된다. 연장된 처리에서, 사이토칼라신 B의 존재 또는 부재 하에서, 시험물질로 세포의 처리를 허락하도록 사양들이 제공된다. 이들 선택사양들은 시험물질과 사이토칼라신 B 사이의 가능한 상호작용에 관하여 우려가 있을 지도 모르는 상황을 다룬다.
- 8.1.4 제안되는 세포 처리 스케줄은 표 1에 제시된다. 이들 일반적인 처리 스케줄은 시험물질의 안정성 또는 반응성, 또는 사용되는 세포의 특정 성장 특징에 의존하여 변경될 수 있다. 모든 처리는 세포가 기하급수적으로 자라는 동안 시작되고 종료되어야 한다. 이들 스케줄은 아래에 좀 더 자세히 기술된다.

표 1. 시험관내 포유류 세포 소핵시험 관련 세포 처리 및 회수 시간

사이토칼라신 B 로 처리된 림프구, 초대 세포, 세포주	S9 추가	① S9의 존재 하에서 3-6시간동안 처리; ② S9과 처리 배지를 제거; ③ 새 배지와 사이토칼라신 B를 추가; ④ 1.5~2.0 정상 세포 주기 이후에 회수
	S9 없이 단기 노출	① 3-6 시간 처리 ② 정상 세포 주기 이후 ③ 처리 배지 제거; ④ 새로운 배지와 사이토칼라신 B 추가; ⑤ 1.5~2.0 정상 세포 주기 이후에 수거
	S9 없이 노출 연장	<u>사양 A :</u> ① 사이토칼라신 B의 존재 하에, 1.5~정상 세포 주기 동안 처리 ② 노출 기간의 끝에 수거 <u>사양 B :</u> ① 1.5~2.0 정상 세포 주기 동안 처리 ② 시험물질 제거 ③ 새로운 배지와 사이토칼라신 B 추가 ④ 1.5~2.0 정상 세포 주기 이후에 수거
사이토칼라신 B 없이 시험물질 처리된 세포주 (사이토칼라신 B 무첨가를 제외하면, 위에서 서술한 처리 스케줄과 동일함)		

8.2 사이토칼라신 B로 림프구, 초대배양세포, 세포주

8.2.1 림프구에 대하여, 가장 효과적인 접근은 주기 동시화가 사라지는 PHA 자극 후 44~48 시간이 되었을 때 시험물질에 노출을 시작하는 것이다. 초기 시험에서, S9의 존재 시와 부재 시에서, 세포가 3~6시간 동안 시험물질로 처리된다. 처리된 배지는 제거하고, 사이토칼라신 B를 포함한 새로운 배지로 교체한다. 그리고 세포는 1.5~2.0 정상 세포 주기 이후에 수거된다.

8.2.2 단기 (3~6 시간) 처리의 초기 시험이 음성이거나 의양성이라면, S9 없이 다음의 연장된 노출 처리가 사용된다. 두 처리 사양은 모두 가능하며 동등하게 용인된다. 그러나, 자극을 받은 림프구에 대하여 사양 A를 따르는 것이 더 적합할지도 모른다. 자극에 이어 지수 성장이 96시간에서 감소하고 있을지도 모른다. 또

한, 세포의 배양은 사양 B에서, 마지막 수거 시간까지 융합에 도달하지 말아야 한다.

- 사양 A : 시험물질로 처리된 세포는 1.5~2.0 정상 세포 주기 동안 처리되고, 처리 종료 시에 회수된다.
- 사양 B : 세포는 1.5~2.0 정상 세포 주기 동안 시험물질로 처리되고, 처리 배지는 제거하고 새 배지로 교체한다. 그리고 세포는 추가적인 1.5~2.0 정상 세포 주기 후에 수거한다.

8.2.3 44-48시간 동안 PHA로 그들을 자극할 필요가 없는 것을 제외하면 초대 세포와 세포주는 림프구와 비슷한 방식에서 처리되어야 한다. 림프구와 다른 세포들은 시험 종료 시점에 세포는 여전히 log-phase 대수증식기에 있도록 노출되어야 한다.

8.3 사이토칼라신 B 없이 세포주

8.3.1 세포는 S9 존재, 부재시 3~6 시간 동안 시험물질로 처리되어야 하며, 처리 배지는 제거하고 새로운 배지로 교체한다. 그리고 세포는 1.5~2.0 정상 세포 주기 이후에 수거된다.

8.3.2 단기 (3-6 시간) 처리의 초기 시험 둘 다에서 음성 또는 의양성이라면, S9 없이 그다음 연장된 노출 처리된다. 두 처리 사양 모두 가능하며, 동등하게 용인된다:

- 사양 A : 세포에 시험물질을 1.5~2.0 정상 세포 주기 동안 처리하고, 처리 끝나는 시간에 회수한다.
- 사양 B : 세포에 시험물질을 1.5~2.0 정상 세포 주기 동안 처리하고, 처리 배지를 제거하고 새로운 배지로 교체한다. 그리고 세포를 추가적인 1.5~2.0 정상 세포 주기 후에 수거한다.

8.3.3 단층에서, 체세포 분열 세포들 (표면에서 떨어져 둥근 것으로 인식가능함)은 3-6 시간 처리 끝에 존재할지도 모른다. 이들 체세포분열 세포들은 쉽게 떨어

어지기 때문에, 시험물질을 포함한 배지가 제거될 때 손실될 수 있다. 세포들을 수거하는데 세척하고 다시 배양할 때 체세포분열에 있는 세포를 손실하는 것을 피하기 위해, 수거시기에 위험한 환경에 있는 소핵에 대하여, 주의가 동원되어야

한다.

8.4 배양 수

8.4.1 각각의 시험 물질 농도에 대해 그리고 부형제/용매와 음성대조군 배양에 대하여 복수 배양이 사용되어야 한다. 복수 배양 사이의 최소 변이가 실험실에 축적된 데이터로부터 입증될 수 있다면, 단수 배양이 사용되는 것이 수용될 수도 있다. 단수 배양이 사용된다면, 농도군 개수를 늘려 분석되는 것이 권고된다.

8.5 세포 수거 및 슬라이드 제작

8.5.1 각각의 배양은 수거되어 따로따로 진행된다. 슬라이드 상에서 충분히 세포가 퍼지도록 저장액 처리를 할 수도 있으나, 이 단계는 필수적이지 않다. 슬라이드 준비 시, 세포에서 소핵 계수가 용이하도록 다른 기술들이 사용될 수 있다. 세포질 분열 억제 방법에서 소핵의 확인과 이핵 세포의 신뢰성 있는 확인을 위해 세포의 세포질이 존재하여야 한다.

8.5.2 Giemsa 또는 DNA 특이적인 형광 염색시약처럼 다양한 방법을 사용하여, 슬라이드 표본이 염색될 수 있다. DNA 특이적인 염색의 사용 (즉, acridine orange 또는 Hoechst 33258 + pyronin-Y)은 DNA 비특이적인 염색을 사용하여 생성될 수 있는 인공산물 일부를 제거할 수 있다. 소핵 형성 과정에 관심이 있다면, 적절한 DNA 대조염색과 더불어, 항동원체 항체, 동원체 DNA 탐침으로 FISH, 또는 동원체 특이적인 프라이머로 원위치 표지 방법이 소핵의 내용물(염색체/염색체 조각)을 확인하는데 사용될 수 있다. 염색체이상 유발물질과 이수체 유발원 구별에 대한 다른 방법이 사용될 수도 있다.

8.6 분석

8.6.1 용매/부형제와 대조군을 포함한 모든 슬라이드 표본은 독립적으로 현미경 분석 전에 코드화(암호화)되어야 한다. 또는 입증된, 자동화된 유세포분석기 또는 이미징 분석 시스템을 사용하여, 암호화된 시료가 분석될 수 있다.

8.6.2 사이토칼라신 B 처리시, 한 농도 당 적어도 2,000개 이핵세포에서 소핵 빈도가 분석되어야 한다. (같은 농도 당 2배수로 시험하고, 한 개의 배양기에서 1,000개

이핵 세포를 계수한다.) 한 개의 배양기를 사용한다면, 한 농도 당 적어도 2,000 개의 이핵 세포가 계수되어야 한다. 한 농도군 당 1,000개의 이핵 세포에 상당히 못미치거나, 단일 배양기가 사용되었을 때 각 농도에서 계수하는데 2,000개 이핵 세포가 이용가능하다면, 소핵의 유의미한 증가가 감지되지 않는다면, 독성이 덜한 농도에서 좀 더 많은 세포를 사용하여 시험이 반복되어야 한다. 부정형의 또는 두 개의 핵이 크기에서 크게 다른 이핵 세포를 계수하지 않도록 주의가 필요하다. (둘 다 이핵세포가 빈약하게 퍼진 확산된 다핵 세포들과 혼동된다.) 소핵빈도 기준치가 더 높을지도 모르기 때문에, 2개 이상의 주핵을 포함한 세포들은 소핵에 대하여 분석되면 안된다. 시험물질이 사이토칼라신 B 활성을 방해하는 것으로 보인다면, 단핵 세포들을 계수하는 것이 허용된다.

8.6.3 사이토칼라신 B 처리 없이 수행된 세포주에서, 한 농도 당 적어도 2,000개 세포에서 소핵이 계수되어야 한다. (배양기 당 적어도 1,000개 세포; 처리농도군 당 2배수) 농도군 당 오직 한 배양기가 사용된 곳에서, 적어도 2,000개의 세포가 그 배양기에서 계수되어야 한다.

8.6.4 사이토칼라신 B가 사용될 때, 세포 증식을 평가하기 위하여 배양기 당 적어도 500개의 세포를 사용하여, CBPI 나 RI가 결정되어야 한다. (별첨 2를 보시오.) 위에서 논의된 것처럼, 사이토칼라신 B 없이 시험물질을 처리하였을 때, 계수된 세포가 증식하고 있다는 증거를 제공하는 것이 필수적이다.

8.7 허용 기준

8.7.1 이 시험 가이드라인에서 기술된 시험관내 포유류 세포 소핵시험을 수행할 실험실은 별첨 3에서 기준 물질을 사용하여, 알려진 음성 물질 뿐만 아니라 대사 활성화 유무를 가지고 알려진 이수체 유발원, 염색체이상 유발물질 활

성을 갖는 물질을 재현성 있고 정확하게 감지하는 능력을 입증해야 한다. 이 시험 방법을 정확하게 수행하는 능력의 증거로, 사이토칼라신 B를 사용하지 않고 시험이 수행된다면, 실험실은 소핵 형성에 대해 계수되는 세포들이 한번 핵분열을 완료했다는 증거를 제시하여야 한다.

8.7.2 별첨 3의 화학물질이 기준 화학물질로서 사용이 추천된다. 활성이 알려져 있고, 같은 작용기전에 의해 소핵을 유도한다면, 시험관내 포유류 세포 소핵시험 절차를 사용하여 시험될 화학물질과 관련있는 것으로 보여진다면, 대체 또는 추가 화

학물질이 포함될 수 있다. 타당한 이유는 폭넓게 다양한 물질 또는 시험물질이 속한 화학물질군에 기반한 좁은 스펙트럼에 집중된, 시험물질 또는 연구되는 손상 기전에 관한 확인 연구를 포함할 수 있다.

8.7.3 용매/부형제 대조군과 처리하지 않은 배양기에서는 재현성있게 낮고, 일관된 소핵 빈도를 제공해야 한다(전형적으로 5~25개 소핵/1,000개 세포). 세포 유형에 따라 다른 범주의 소핵빈도를 가질 수 있으며, 시험관내 포유류 세포 소핵시험에서 사용하기 위해 입증할 때 결정되어야 한다. 음성대조군, 용매대조군, 양성 대조군의 데이터는 실험실에 축적되는 대조군 범주를 확립하는데 사용되어야 한다. 이들 값은 실험 시 동시에 수반되는 음성/양성 대조군의 타당성을 결정하는데 사용되어야 한다.

8.7.4 프로토콜에서 작은 변화(즉, 수동 계수 기법 대신 자동화된 기법의 사용, 새로운 세포 유형의 사용)가 시험에 제안된다면, 그때 변화의 유효성이 변경된 프로토콜 사용이 용인되는 것이 고려되기 전에 입증되어야 한다. 유효성을 입증하는 것에는 개개의 물질의 부류에 대하여 또는 시험되는 폭넓은 범주의 물질에 대하여 염색체 절단 및 획득 또는 손실의 주요 기전이 확인될 수 있고, 적합한 양성 그리고 음성 결과가 획득될 수 있음을 입증하는 것을 포함한다.

9. 데이터 및 보고

9.1 결과의 처리

9.1.1 세포질분열-억제 기법이 사용된다면, (세포 당 소핵 수와 독립적으로) 오직

소핵을 갖는 이핵 세포의 빈도가 소핵 유발의 평가에 사용된다. 한개, 두개 또는 그 이상의 소핵을 갖는 세포 수를 계수하는 것은 유용한 정보를 제공할 것이나, 의무사항은 아니다.

9.1.2 모든 시험물질처리군과 용매/부형제 대조군에 대한 세포독성과 세포증식 억제가 측정되어야 한다. CBPI나 RI는 세포질분열억제 방법이 사용될 때, 세포주기 지연의 측정으로서 모든 처리군과 대조군에 대해 계산될 수 있다. 사이토칼라신 B의 부재 하에서, RPD 또는 RICC 또는 PI가 사용되어야 한다. (별첨 2 참조)

9.1.3 개개의 배양 자료가 제공되어야 하며, 추가적으로 모든 데이터는 표 형태로 요약되어야 한다.

9.1.4 시험관내 포유류 세포 소핵시험에서 소핵을 유도하는 화학물질은 염색체 절단, 염색체 손실, 또는 이 둘의 조합을 유도하기 때문에 소핵을 유도할 것 같다. 항동원체 항체를 사용한 추가 분석, 원위치 탐침 특이적인 동원체, 그 외 다른 방법이 소핵 유발의 기전이 염색체이상 유발물질, 이수체 유발원 활성화에 기인한지를 결정하기 위하여 사용될 수 있다.

9.2 평가 및 결과의 해석

9.2.1 분명한 양성 또는 음성 반응의 추가적인 시험에 의한 입증을 위한 요구사항은 없다. 의양성 결과는 맹검법에 손상을 입히지 않으면서 추가적으로 1,000개 세포를 분석함으로써 명확해질 수 있다. 이러한 접근이 결과를 해결하지 않는다면, 추가적인 시험이 수행되어야 한다. 확장된 또는 좁혀진 범주의 조건을 넘어서는 시험 매개변수의 변경이 타당하다면, 추가 실험에서 고려되어야 한다. 시험 농도 간격, 세포 수거, 처리 시간, 대사활성화 조건이 변경 가능한 시험 변수에 해당한다.

9.2.2 소핵을 포함한 세포 수에서 농도-상관적인 증가 또는 통계적으로 유의미한 증가 같은 양성 결과를 결정하기 위한 몇 가지 기준이 있다. 결과의 생물학적 타당성이 맨 먼저 고려되어야 한다. 관찰된 값이 실험실 내에 축적된 대조군 범주 안 또는 밖에 있는지 고려함은 생물학적 반응의 의미를 평가할

때 지침을 제공할 수 있다. 시험 결과를 평가하는데 도움을 줄 적합한 통계 방법은 사용 수 있으며, 이러한 통계적 시험의 결과는 양-반응 상관관계의 관점에서 평가되어야 하고, 재현가능성과 실험실 내 축적된 데이터 또한 고려되어야 한다.

9.2.3 대부분의 실험은 분명한 양성 또는 음성 결과를 제공하나, 일부 자료의 경우 실험이 반복되는 회수에 상관없이 의양성으로, 시험물질의 활성화에 관하여 확실한 판단을 만드는 것을 불가능하게 할 것이다.

9.2.4 시험관내 포유류 세포 소핵시험 양성 결과는 포유류 배양세포에서 시험물질이 염색체 손실을 유도하는 것을 제시하며, 시험관내 포유류 세포 소핵시험 음성 결과는 사용된 시험 조건하에서, 시험물질이 포유류 배양 세포 내에서 염색체 획득 또는 손실을 유도하지 않는다는 것을 제시한다.

9.3 시험 보고서

9.3.1 시험보고서는 다음 정보를 포함하여야 한다.

시험물질 :

- 식별 자료와 CAS 등록번호
- 물리적 특성 및 순도
- 시험 수행과 관련된 물리화학적 특성
- 용매/부형제 또는 세포 배양액과 시험물질의 반응성

용매/부형제 :

- 용매/부형제 선택의 타당성
- 용매/부형제에서 시험 물질의 용해도 및 안정성

세포 :

- 사용되는 세포의 유형 및 근원
- 사용되는 세포 유형의 타당성
- (적용 가능 시) 마이코플라스마의 부재
- 세포분열주기, 배가시간 또는 증식 지수에 관한 정보
- (적용 가능 시) 림프구 사용 시, 성별, 연령, 기증자 수
- 림프구 사용 시, 전혈 또는 분리된 림프구 사용여부
- (적용 가능 시) 계대회수
- (적용 가능 시) 세포 배양 유지 방법
- 염색체수 최빈값
- 정상(음성 대조군) 세포 주기

시험 조건 :

- 세포질분열 억제물질(즉, 사이토칼라신 B) 사용 시, 사용된 물질, 세포 처리 농도, 처리 시간
- 세포독성 자료와 용해도 제한을 포함한 농도군 수와 농도 선택 사유
- (적용 가능 시) 배지의 조성, CO₂ 의 농도
- 시험물질 농도
- 추가된 부형제와 시험물질의 농도(부피)
- 배양 온도 및 시간
- 처리 지속 기간
- 처리 후 수거 시간

- (적용 가능 시) 세포 파종 시 세포 밀도
- 허용 기준을 포함한 대사활성화계의 유형 및 조성
- 양성대조와 음성대조
- 슬라이드 제작 방법과 사용되는 염색방법
- 소핵 확인 기준
- 분석되는 세포의 수
- 세포독성 측정 방법
- 세포독성 관련 추가 정보
- 양성, 음성, 의양성으로 고려되는 시험의 기준
- 사용되는 통계분석방법
- (적용 가능 시) 소핵이 전염색체 또는 염색체 조각을 포함하는지 특징짓기 위한 키네토코어 항체의 사용과 같은 방법

결과 :

- 사용된 세포독성의 측정방법
- 세포질분열 억제 방법 사용시, CBPI 또는 RI
- 세포질분열 억제 방법 미사용시, RICC, RPD 또는 PI
- 적용가능시, 세포 증식 척도, 세포자멸사, 괴사, 중기 계수, 이핵세포의 빈도
- 침전의 징후
- 처리 배지의 pH와 오스몰농도에 관한 자료
- 분석 허용 가능 세포의 정의
- 세포질분열 억제 방법 사용시, 단핵, 이핵, 다핵 세포의 분포
- 시험물질 처리군과 대조군에서 소핵을 가진 세포의 수
- 이핵 세포 또는 단핵 세포의 정의
- 용량-반응 상관관계
- 음성대조군(용매/부형제)과 양성 대조군 데이터(농도 및 용매)
- 실험실에 축적된 음성 대조군(용매/부형제)과 양성 대조군 데이터, 범주, 평균 및 표준편차, 신뢰구간(즉, 95%)
- 통계분석(가능하다면, p-value)

결과의 논의 :

결론 :

별첨 1 세포독성 평가를 위한 계산식

1. 사이토칼라신 B가 사용될 때, 세포독성의 평가는 세포질분열억제 증식지수 (CBPI) 또는 복제지수(RI)에 기반을 두어야 한다. CBPI는 사이토칼라신 B에 노출 되는 기간 동안 세포당 평균 세포주기 수를 나타내며 세포 증식을 계산하는데 사용 될 수 있다. RI는 대조군에 비교하여, 처리군에서 핵의 상대적인 수를 제시하고, % 성장억제를 계산하는데 사용될 수 있다 :

$$\% \text{ 성장억제} = 100 - 100 \{ (\text{처리군의 CBPI} - 1) \div (\text{음성대조군의 CBPI} - 1) \}$$

$\text{CBPI} = \frac{((\text{단핵세포 수}) + (2 \times \text{이핵세포수}) + (3 \times \text{다핵세포수}))}{(\text{전체 세포 수})}$
--

그래서, CBPI = 1 (모든세포가 단핵이다)은 100% 성장억제와 동일하다.

$$\text{성장억제} = 100 - \text{RI}$$

$\text{RI} = \frac{\text{처리군의 } ((\text{이핵세포수}) + (2 \times \text{다핵세포수})) \div (\text{전체세포수})}{\text{음성대조군의 } ((\text{이핵세포수}) + (2 \times \text{다핵세포수})) \div (\text{전체세포수})} \times 100$
--

2. 그래서 RI = 53% 는 대조군에서 이핵세포와 다핵세포를 형성하기 위해 분열된 세포 수에 비교해서, 처리군에서 오직 53%가 분열되었다. 즉, 47%가 세포증식억제 되었다는 것을 의미한다.
3. 사이토칼라신 B가 사용되지 않을 때, 둘 다 분열되는 세포 군의 비율을 고려하기 때문에, 세포계수시 상대증가(RICC) 또는 상대군집배가(RPD)에 근거한 세포독성 평가가 권고된다.

$\text{RICC} = \frac{\text{처리군의 세포수 증가분(수거시-처리개시시)}}{\text{음성대조군의 세포수 증가분(수거시-처리개시시)}} \times 100$
--

$\text{RPD} = \frac{\text{처리군의 군집 배가 수}}{\text{음성대조군의 군집 배가 수}} \times 100$

$$PD(\text{Population Doubling}) = [\log (\text{수거시 세포수} \div \text{처리개시시 세포수})] \div \log 2$$

4. 따라서 RICC 또는 RPD = 53% 는 47%의 세포독성/세포증식을 억제함을 제시한다.
5. 증식지수(PI) 증식지수를 사용함으로써, 1개 세포(c11), 2개 세포(c12), 3 ~4 개 세포 (c14), 그리고 5~8개 세포(c18)로 구성된 클론의 수를 계수하는 것을 통해 세포독성이 평가될 수 있다.

$PI = \frac{((1 \times c11) + (2 \times c12) + (3 \times c14) + (4 \times c18))}{(c11 + c12 + c14 + c18)}$
--

6. PI 역시 사이토칼라신 B의 부재 시, 원위치에서 배양된 세포주에 대하여 가치있고, 재현성 있는 세포독성 지표로서 사용되어왔다.

별첨 2 실험실 숙련도 평가 및 양성 대조군 선택에 권장되는 참고 물질

범주	화학물질	CAS 등록번호
1. 대사활성화 없이 활성화되며 염색체 절단을 야기하는 물질		
	Methyl methanesulphonate	66-27-3
	Mitomycin C	50-07-7
	4-Nitroquinoline-N-Oxide	56-57-5
	Cytosine arabinoside	147-94-4
2. 대사활성화를 요구하며 염색체 절단을 야기하는 물질		
	Benzo(a)pyrene	50-32-8
	Cyclophosphamide	50-18-0
3. 방추사 형성 억제제		
	Colchicine	64-86-8
	Vinblastine	143-67-9