

KOSHA GUIDE

W - 10 - 2023

화학물질의 발암성시험 기술지침

2023. 8

한국산업안전보건공단

안전보건기술지침은 산업안전보건기준에 관한 규칙 등 산업안전보건법령의 요구사항을 이행하는데 참고하거나 사업장 안전·보건 수준향상에 필요한 기술적 권고 지침임

안전보건기술지침의 개요

○ 작성자 : 김 수 진

○ 개정자 : 이 미 주

안전보건공단 산업안전보건연구원 이미주

○ 제·개정경과

- 2011년 11월 산업위생분야 기준제정위원회 심의
- 2015년 5월 산업독성분야 제정위원회 심의(개정, 법규개정조항 반영)
- 2018년 9월 산업독성분야 기준제정위원회 심의(개정)
- 2019년 11월 산업독성분야 기준제정위원회 심의(개정)
- 2020년 12월 산업독성분야 기준제정위원회 심의(개정)
- 2023년 7월 산업독성분야 표준제정위원회 심의(개정)

○ 관련규격 및 자료

- OECD Guidelines for the Testing of Chemicals 451 : Carcinogenicity Study

○ 관련법규·규칙·고시 등

- 산업안전보건법 제105조(유해인자의 유해성·위험성 평가 및 관리)
- 산업안전보건법 시행규칙 제142조(유해성·위험성 평가대상 선정기준 및 평가방법)
- 고용노동부 예규 제203호(화학물질의 유해성·위험성 평가에 관한 기준)
- 국립환경과학원 고시 제2023-19호(화학물질의 시험방법에 관한 규정)
- 식품의약품안전처 고시 제2022-18호(의약품등의 독성시험기준)

○ 안전보건기술지침의 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 : 2023년 8월 24일

제 정 자 : 한국산업안전보건공단 이사장

목 차

1. 목적	1
2. 적용범위	1
3. 용어의 정의	1
4. 발암성시험의 절차	2
4.1 시험의 설계	2
4.2 시험의 설계 시 고려사항	3
4.3 시험의 유지	5
4.4 시험 절차	5
4.5 시험 자료	7
4.6 최종보고서	7

화학물질의 발암성시험 기술지침

1. 목적

이 지침은 「산업안전보건법」, 산업안전보건법 시행규칙, 고용노동부 예규, 국립환경과학원 고시 등에 따라 화학물질 취급 및 노출에 의한 독성 및 건강장해에 관한 정보를 제공하기 위해 실시하는 발암성시험 시험방법의 기술적 제안을 목적으로 한다.

2. 적용범위

이 지침은 「산업안전보건법」, 산업안전보건법 시행규칙, 고용노동부 예규, 국립환경과학원 고시 등에 의거 실험동물을 이용한 발암성시험의 수행 및 결과의 작성에 적용한다.

3. 용어의 정의

(1) 이 지침에서 사용되는 용어의 정의는 다음과 같다.

(가) “시험동물”이라 함은 건강동물로서 시험목적으로 사용되는 품종이 확실한 동물을 말하며, 설치류는 특정병원체부재(Specific pathogen free, SPF)동물을 사용함을 원칙으로 한다.

(나) “발암성시험(Carcinogenicity study)”이라 함은 시험물질을 시험동물에 장기간 투여하여 암(종양)의 유발여부를 질적, 양적으로 검사하는 시험을 말한다.

(다) “발암성(Carcinogenicity)”이라 함은 화학물질을 노출시켰을 때 실험동물에 신생물을 유발시키는 화학물질의 성질을 말한다.

(라) “기준용량(Benchmark dose, BMD)”이라 함은 독성영향이 대조집단에 비해 일정 비율 이상 증가했을 때 이에 해당되는 노출량을 추정 한 값으로 주로 5% 또는 10% 증가에 대한 값을 평가한다.

- (마) “기준용량 하한값(Benchmark dose lower bound, BMDL)”이라 함은 노출-반응 모형에서 추정된 기준용량의 신뢰구간의 하한값을 말한다.
- (바) “최대무독성용량(No observed adverse effect level, NOAEL)”이라 함은 시험물질을 시험동물에 투여하였을 때 독성이 나타나지 않는 최대농도를 말한다.
- (사) “최소독성용량(Lowest observed adverse effect level, LOAEL)”이라 함은 시험물질을 시험동물에 투여하였을 때 독성이 나타나는 최소용량을 말한다.
- (아) “독성시작값” 또는 “시작값(Point of departure, POD)”이라 함은 실험적 또는 관찰데이터로 도출한 독성학적 용량-반응 곡선에서의 한 지점을 말한다. 최대무독성용량, 기준용량 하한값 등이 해당된다.
- (자) “구조-활성 상관관계(Quantitative structure-activity relationship, QSAR)”라 함은 화학물질의 구조와 화학물질에 의한 독성 등의 영향 사이에 정량적 관련성이 있는지를 표현하는 통계적 기법 등을 말한다.

4. 발암성시험의 절차

4.1 시험의 설계

- (1) 시험의 수행 전 물질명, 화학구조 및 물리·화학적 성질, 작용기전, 모든 독성시험 결과, 예상 사용량 및 사람에의 노출 잠재성, 구조-활성 상관관계 자료, 독성동태 자료, 용량결정 시험 결과 등 관련된 모든 자료를 검토한다.
- (2) 시험물질의 노출경로, 군구성, 용량, 노출기간, 동물 종, 동물 수 및 성별 등을 선택한다.
- (3) 일반증상, 체중, 사료/음수 섭취량, 혈액검사, 생화학검사, 부검, 장기중량, 조직병리 검사 등 검사항목을 설정한다.

4.2 시험의 설계 시 고려사항

(1) 시험 개시 전에 발암성시험 설계, 목적, 결과 분석에 가장 적합한 통계 방법을 확립하며 종양발생률, 종양과 사망과의 연관성, 생존율 등을 분석한다.

(2) 동물종의 선택

(가) 이 지침은 설치류를 이용한 발암성 평가를 대상으로 하며 목적에 따라 랫드 또는 마우스를 선택한다.

(나) 단기간의 독성시험에서 사용된 것과 동일한 계통 및 공급처의 동물을 사용한다. 8주령 미만의 체중이 균등한 건강한 수컷과 임신과 출산 경험이 없는 암컷을 사용한다.

(3) 사육환경

동물은 개별 사육하거나 같은 성별끼리 소그룹으로 사육한다. 사육상자는 가능하면 위치 영향을 최소화하는 방향으로 배치한다. 동물실 온도는 $22\pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대 습도는 $50\pm 20\%$ 로 유지하며, 조명은 12시간 주기로 둔다.

(4) 동물의 준비

타 시험에 사용되지 않은 7일 이상 순화기간을 거친 동물을 사용하며 군 분리 시 임의배정을 한다. 각 개체에 고유한 식별 번호를 부여하고 적절한 방법으로 표시한다.

(5) 동물수와 성별

암컷과 수컷 모두 사용하며, 통상 1군당 50마리가 포함되도록 한다.

(6) 실험 도중 긴급부검 결정 및 환경모니터링용 실험동물

투여 후 12개월에 종양 변화의 진행 및 기전 정보를 알기위해 긴급부검을 할 수 있다. 시험동안 질병상태의 감시를 위해 환경모니터링용 동물(성별 당 보통 다섯 마리)을 배치한다.

(7) 실험군과 투여용량

- (가) 용량과 반응과의 관계를 알기위하여 투여량은 3단계로 한다.
- (나) 고통, 사망 없이 표적 장기 및 독성 영향을 확인 할 수 있는 농도를 고농도로 설정 하며, 체중이 감소(약 10%)되는 정도의 독성 영향이 나타나는 농도로 설정한다.
- (다) 투여 농도 및 간격은 물질의 작용기전, 최대무독성용량, 동물에서 유해영향을 나타내는 최소독성용량 등을 고려하여 용량-반응이 성립되도록 설정한다. 저농도는 용량-반응 곡선 내에 포함되도록, 대사 시 일어나는 중요한 변화가 포함되도록 설정한다.
- (라) 적절한 용량을 설정하기 위해 용량-반응 곡선, 독성동태, 기전, 기준용량 하한값, 사람에의 노출 수준 등도 함께 고려한다.
- (마) 시험물질을 처리하지 않은 군 또는 부형제를 처리한 군을 대조군으로 설정한다. 시험물질을 사료로 투여 시 사료섭취감소를 보인다면 추가적인 대조군을 둘 수 있다.

(8) 시험물질의 준비 및 투여

- (가) 시험물질은 보통 사료, 음용수 또는 위삽관을 통해 경구투여되나, 투여 경로 및 방법은 시험 목적, 시험물질의 물리적·화학적 성상, 선호되는 경로, 사람 노출 경로 등을 고려하여 결정한다.
- (나) 필요 시 시험물질은 적합한 부형제에 용해 또는 현탁시킨다. 시험물질의 흡수, 분포, 대사, 유지에 대한 영향, 독성물질로 전환가능성, 사료 및 음용수 섭취 영향, 동물의 영양 상태 등이 부형제 및 첨가제 선택시 고려되어야 한다. 수용액/현탁액의 사용이 1차적으로 고려되며, 수용액/콘오일 등 오일에 현탁액이 다음 순으로 고려된다. 물이 아닌 부형제를 사용할 경우 그 독성이 알려져 있어야 한다. 투여되는 시험물질의 안전성 및 균질성에 관한 정보가 제공되어야 한다.
- (다) 사료 또는 음용수를 통해 투여되는 물질에 대하여 관련 시험물질의 양이 정상 영양 또는 수분 균형을 방해하지 않는다는 것을 입증하는 것이 중요

하다. 영양 불균형을 피하기 위하여 사료에 포함된 화학물질의 농도는 보통 총 사료의 5% 상한을 넘지 말아야 한다. 사료로 투여 시 주 단위로 계산하여 일정한 사료 농도 또는 용량 수준을 유지한다.

(라) 경구투여의 경우 24시간/일, 7일/주 투여한다. 5일/주 투여도 가능하며, 경피투여 시에는 24개월 동안 6시간/일, 7일/주 투여된다. 흡입노출 시 6시간/일, 7일/주 수행되나, 5일/주 노출도 가능하다. 랫드와 다른 설치류가 비부노출(Nose-only)로 노출된다면, 중 특이적인 스트레스를 최소화하기 위해 적응되어야 한다.

(마) 시험물질이 동물에 위삽관으로 투여 시, 매일 1회 투여되나 자극이 있는 물질일 경우 2번 투여도 가능하다. 실험동물 크기에 따라 최고용량을 설정해야 하며, 1 ml/100 g 체중을 초과해서는 안 된다. 부식성이나 자극성이 있는 물질은 심각한 국부 손상을 피하기 위해 희석하여 투여가능하다.

4.3 시험의 유지

시험동물의 거의 전생애에 걸쳐 투여한다. 보통 설치류 중 랫드는 24개월, 마우스는 18개월을 투여한다.

- (1) 저농도 노출군 또는 대조군에서 생존율이 25% 아래로 떨어졌을 때 시험 종료를 고려 한다.
- (2) 고농도 노출군에서만 독성에 의해 일찍 죽는 경우로 인해 시험의 종료를 앞당겨서는 안된다.
- (3) 생존 결과는 성별마다 따로 고찰한다.
- (4) 시험 후 이용 가능한 데이터가 통계적으로 유효하지 않더라도 시험 기간을 연장하여서는 안 된다.

4.4 시험 절차

(1) 일반증상 관찰

매일 모든 동물의 일반상태, 질병 및 사망 유무를 확인하며, 종양 발생의 시

기, 위치, 면적, 형태를 기록 한다.

(2) 체중, 사료/음수 섭취량

모든 동물은 투여 시작일부터 13주까지는 1주일에 1회, 그 이후에는 1개월에 1회 측정한다.

(3) 혈액학, 생화학, 기타 측정

혈액, 뇨, 골수 등 필요에 따라 시료를 채취하여 검사한다. 군당 성별 당 최소 10마리에서 채취한다.

(4) 부검

(가) 사망동물, 빈사동물, 시험물질 투여(노출)이 종료된 동물은 외관, 체공, 두개강, 흉강, 복강 및 그 내부 장기를 면밀히 관찰한다. 환경모니터링에 사용된 동물은 시험책임자의 재량 하에 부검을 실시한다. 장기 중량 측정은 통상적으로는 발암성시험에서 수행하지 않으나 작용 기전을 고려하고, 평가를 위한 증거자료 축적을 위해 수행할 수 있다.

(나) 육안 관찰이 끝나면 조직병리학 검사를 위해 뇌, 척수, 말초신경, 뇌하수체, 안구, 하더샘, 침샘, 눈물샘, 비강, 폐, 인두, 기관, 후두, 후각망울, 시신경, 치아, 혀, 식도, 위, 십이지장, 공장, 회장, 맹장, 결장, 직장, 피부, 침샘(턱밑샘, 혀밑샘, 귀밑샘), 림프절(장간막 림프절, 기관기관지림프절 등), 갑상샘, 가슴샘, 대동맥, 심장, 간장, 췌장, 비장, 신장, 부신, 부갑상샘, 방광, 골격근, 고환(수컷), 부고환(수컷), 정낭(수컷), 전립샘(수컷), 응고샘(수컷), 포피샘(수컷), 젖샘, 난소(암컷), 자궁(암컷), 질(암컷), 음핵샘(암컷), 흉골(골수 포함), 대퇴골(관절, 골수포함), 투여부위 등을 적출하여 장기별 적합한 고정액에서 보존한다. 시험설계 시 노출경로, 독성자료 등을 검토하여 이 중 불필요한 장기는 제외한다.

(5) 조직병리학적 검사는 다음 조직에 대해 실시한다.

(가) 고농도군과 대조군의 모든 조직

(나) 시험기간 동안 사망하거나 긴급 부검한 동물의 모든 조직

- (다) 종양을 포함한 육안적 병변이 관찰된 모든 조직
- (라) 고농도 군에서 시험물질에 기인한 변화가 관찰된 저농도 및 중농도군의 조직
- (마) 신장, 부신 등 양측성 장기의 양측 모두

4.5 시험 자료

- (1) 평가되는 모든 지표에 대하여 각 동물별로 기록된 자료가 있어야 하며, 이러한 모든 자료는 표 형태로 요약한다. 숫자로 된 데이터의 요약 자료에는 평균과 표준편차가 제공되어야 한다.
- (2) 실험실에 축적된 대조군 자료는 시험 결과의 해석 시 도움이 될 수 있다.
- (3) 얻어진 데이터에 대해 통계 분석을 실시한다. 이 때 각 항목별로 적절한 통계법을 적용한다. 통상적으로 생존율은 윌콕슨 분석(Generalized Wilcoxon test), 카플란-마이어 방법(Kaplan Meier method), 로그 순위 방법(Log-rank test), 콕스 비례위험 분석(Cox's proportional hazards model) 등을 사용하며, 종양발생율은 Peto 방법(Peto test), Poly-k 방법(Poly-3 test) 등을 이용할 수 있다.

4.6 최종보고서

최종보고서는 다음 정보를 포함한다.

- (1) 시험기관의 명칭 및 소재지
- (2) 시험책임자 및 담당자 성명
- (3) 시험물질 정보
 - (가) 물리적 성질과 순도
 - (나) 이화학적 성질
 - (다) 시험물질의 안정성

(라) 로트번호 등 식별정보 및 CAS 번호

(마) 시험물질의 용매 내에서의 용해도와 안정성

(4) 용매/보조제 종류 및 선정 근거

(5) 실험동물

(가) 사용되는 종/계통, 선택사유(정당성)

(나) 수, 주령, 성별

(다) 공급처, 사육조건, 사료 등

(라) 시험 개시 시점 및 종료시점에서의 동물 개체 체중

(마) 동물 식별 방법

(6) 시험조건

(가) 투여경로 및 용량 선택사유

(나) 자료 분석에 사용된 통계 방법

(다) 시험물질 배합 및 사료준비 세부사항

(라) 준비한 시험물질의 농도, 안전성, 균질성에 관한 분석결과

(마) 흡입노출일 경우, 비부 및 전신노출 에 대한 정보

(바) 실제 투여량(노출 농도)

(사) 사료와 음수 품질 세부사항

(7) 결과

(가) 일반독성

- ① 생존 자료
- ② 체중 및 체중변화
- ③ 사료 및 음수 섭취량
- ④ 독성동태 자료(가능 시)
- ⑤ 가능 시 검안경, 혈액검사, 생화학검사

(나) 임상관찰 결과

- ① 독성증상
- ② 자연발생, 임상적 관찰기간(일시적 혹은 지속적)
- ③ 장기무게 및 그들의 비율
- ④ 육안 관찰

(다) 조직병리

- ① 비종양 및 종양의 조직병리 확인
- ② 육안병변 및 조직병리 검사 결과간의 상관관계
- ③ 시험물질과 관련된 조직병리학적 병변에 대한 세부적 기술
- ④ 제3자의 검토(피어리뷰)

(8) 고찰 및 결론

- (가) 특정 모델링 접근법에 대한 논의
 - (나) 용량-반응 관계
 - (다) 대조군 데이터 수집 자료(배경자료)
 - (라) MOA(mode of action) 고려
 - (마) 시작값(기준용량, 최대무독성용량, 최소독성용량 등)의 결정
 - (바) 사람과의 관련성
- (9) 결론

안전보건기술지침 개정 이력

□ 개정일 : 2023. 8. 24.

○ 개정자 : 안전보건공단 산업안전보건연구원 이미주

○ 개정사유 : 최신 관련규정 및 연구결과 반영, 중복 내용 삭제 및 내용적 오류 수정

○ 주요 개정내용

- 내용 및 양식의 전반적인 재정비
- 최신 관련규정을 반영한 전반적인 수정
- 관련 연구과제 결과를 반영한 수정

<관련 연구과제>

- 이미주. 흡입독성시험 결과 활용도 제고를 위한 Benchmark Dose 도입 연구, 2022
- 조은상. 화학물질 유해성 평가를 위한 디지털 독성병리 적용시스템 기반 구축 연구, 2022
- 임경택. 생물정보학 기법을 이용한 혼합물질 독성기전 연구, 2021
- 이미주, 차효근, 김민하. 생체지표를 활용한 발암성 조기 탐색법에 관한 연구, 2020
- 양윤정, 이의진, 권민, 권수경, 홍연표. 발암성시험의 통계학적 분석기법 연구. 2019