

KOSHA GUIDE

T - 21 - 2017

화학물질의 생식능 및 차세대 영향시험 기술지침

2017. 10.

한국산업안전보건공단

안전보건기술지침의 개요

- 작성자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 이 용 훈
- 개정자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 이 미 주
- 개정자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 이 미 주

- 제정 경과
 - 2015년 11월 산업독성분야 제정위원회 심의(제정)
 - 2016년 11월 산업독성분야 제정위원회 심의(개정)
 - 2017년 9월 산업독성분야 제정위원회 심의(개정)

- 관련규격 및 자료
 - OECD Guideline for the testing of chemicals
(TG 416, Two-Generation Reproduction Toxicity)(2001)

- 관련법규, 규칙, 고시 등
 - 산업안전보건법 제39조(유해인자의 관리 등)
 - 고용노동부고시 제2015-74호(화학물질의 유해성·위험성시험 등에 관한 기준)
 - 고용노동부고시 제2016-19호(화학물질의 분류·표시 및 물질안전보건자료에 관한 기준)

- 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 관련규격 및 자료, 법규 등에 관하여 최근 개정본이 있을 경우에는 해당 개정본의 내용을 참고하시기 바랍니다.

공표일자 : 2017년 10월 24일

제 정 자 : 한국산업안전보건공단 이사장

화학물질의 생식능 및 차세대 영향 시험 기술지침

1. 목적

이 지침은 산업안전보건법 제39조(유해인자의 관리 등), 화학물질의 유해성·위험성시험 등에 관한 기준(고시 제2015-74호)에 따라, 화학물질 취급 및 노출에 의한 독성 및 건강장해에 관한 정보를 제공하기 위한 화학물질의 생식능 및 차세대 영향 시험방법에 관한 지침을 정함을 목적으로 한다.

2. 적용범위

이 지침은 산업안전보건법 제39조(유해인자의 관리 등), 제40조(화학물질의 유해성·위험성 조사) 및 고용노동부고시 제2015-74호(화학물질의 유해성·위험성 시험 등에 관한 기준)에 의거 화학물질의 노출에 의한 생식능 및 차세대 영향에 관한 독성시험에 적용한다.

3. 용어의 정의

(1) 이 지침에서 사용되는 용어의 정의는 다음과 같다.

(가) "생식능(Reproduction ability)"이란 수컷 또는 암컷이 교미를 하여 자손을 생산할 수 있는 능력이다.

(나) "모동물(Parental generation, P)"이란 생식독성시험에서 자손을 생산하는 수컷 또는 암컷의 부모세대를 지칭한다.

(다) "차산자(First finial generation, F1)"이란 모동물(P) 수컷과 암컷이 교미를 해서 생산한 자손을 말한다.

(라) "차차산자(Second finial generation, F2)"이란 차산자(F1)의 수컷과 암컷이 교미를 해서 생산한 자손을 말한다.

(마) “우수실험실 운영규정(Good Laboratory Practice, 이하 “GLP”라 한다)”란 의약품, 화장품 등의 안전성 평가를 하여 실시하는 각종 독성시험의 신뢰성을 보증하기 위하여 연구인력, 실험시설·장비, 시험방법 등 시험의 전과정에 관련되는 모든 사항을 조직적, 체계적으로 관리하는 규정을 말한다.

(2) 그 밖의 용어의 뜻은 이 지침에서 특별한 규정이 있는 경우를 제외하고는 산업안전보건법, 동법시행령, 동법시행규칙에서 정하는 바에 의한다.

4. 시험의 준비

4.1 시험동물

4.1.1 동물종

(1) 랫드 또는 마우스 와 같은 설치류 중 1종을 선택한다.

(2) 계통 및 품종의 선택은 동물종, 계통 또는 품종을 선택하는데 있어서는 수태 능력, 자연발생기형의 발생빈도, 기타 생식독성물질에 대한 감수성 등을 고려한다.

4.1.2 동물 수

부검 시점에 임신된 암컷 개체의 수가 각 용량군 마다 20마리 이상이 되도록 한다. 이때 모체 사망률은 10%를 넘지 않아야 한다. 특히 임신된 암컷 개체가 16마리 이하이면 적절하지 않으므로 암컷 동물 수는 충분하여야 한다.

4.1.3 사육조건

(1) 실험동물은 관찰을 용이하게 하기 위하여 개별적으로 사육한다.

(2) 실험동물을 사육하는 공간의 온도는 $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ 가 되도록 한다.

(3) 상대습도는 50~60%를 유지해야하며, 30~70%를 넘지 않아야 한다.

- (4) 개별 케이지 사용이 이상적이다. 그러나 동물의 수가 적을 경우 집단 케이지 사용도 가능하다.
- (5) 케이지는 배치로 인해 미칠 수 있는 영향을 최소화하는 방법으로 배열되어야 한다.
- (6) 음용수는 자유급이로 공급하여야 하며, 일반 실험실용 사료를 공급한다.
- (7) 조명주기는 12시간 간격으로 조절한다.

5. 시험방법

5.1 원리

동물의 암수에 시험물질을 수컷에게는 적어도 1 회의 정자형성기간 동안 암컷에게는 2 회 이상의 발정주기 동안 투여하고 암수를 교미시켜 임신기간 및 수유기동안 계속 시험물질을 투여하여 시험물질의 생식능 및 후세대에 발생에 미치는 영향을 조사한다.

5.2 시험물질

5.2.1 투여방법

경구투여를 원칙으로 한다. 그러나 필요시 흡입노출, 피부노출을 할 수 있다.

5.2.2 용량

용량·반응 관계를 알고, 최대 무작용량을 측정하기 위하여, 원칙적으로 3단계 이상 용량의 시험군을 설정한다. 최고용량은 모동물(P)에서 섭이량의 저하나 체중증가의 억제 등 약간의 독성증상을 나타내지만 10%이상의 사망까지는 가지 않는 양으로 한다. 1,000 mg/kg에서 독성증상이 나타나지 않는 경우는 그 양을 최고용량으로 한다. 최저용량은 태자의 발생에 독성영향이 나타나지 않

는 양으로 한다. 대조군은 별도로 둔다. 부형제가 사용되면 대조군에도 투여를 해야한다.

5.2.3 교배와 시험투여

- (1) 모동물(P) 수컷에는 5~9주령 일때부터 시험물질을 투여하는 데 교미전 10주간(마우스는 8주간)이상 시험물질을 매일 투여한 후 교배를 시킨다. 모동물(P) 암컷동물에는 적어도 교배전까지 2주간 계속 투여하고 다시 3주간의 교배 및 임신기간, 그리고 제1세대, 즉 차산자(F1)의 이유시까지 매일 투여한다. 암수의 동거기간은 2~3주간 정도로 하는데 그동안 매일 교미의 유무를 확인한다.
- (2) 교미가 확인된 암컷은 분리사육하고 자연분만시켜 차산자(F1)를 얻는다. 한 어미에서 태어난 새끼들의 수를 조정할 때에는, 출생 후 비교적 빠른 시기에 새끼들의 암수 숫자를 동일하게 일정한 마리수를 무작위로 남긴다.
- (3) 차산자(F1)을 이유시키는 단계에서 차세대를 얻기 위한 동물을 무작위로 선택하고 나머지는 부검한다. 차세대를 얻기 위한 동물에는, 이유 후 모동물(P) 수컷과 마찬가지로 시험물질을 10주간(마우스에서는 8주간) 이상 투여한 후, 원칙적으로는 각각 다른 어미에서 태어난 암수끼리 20쌍 이상을 만들어 양친동물과 마찬가지로 교배시켜 제2세대, 즉 차차산자(F2)를 얻는다. 차차산자(F2)는 원칙적으로 이유 후 성 성숙기에 이르기까지 시험물질을 투여하고 사육한다.

5.3 관찰 및 측정사항

5.3.1 모동물(P)

- (1) 일반상태 및 사망의 유무를 관찰하고, 체중 및 사료섭취량을 측정하고, 시험물질 섭취량을 산출한다.
- (2) 모동물(P)의 수컷에 대해서는 교미율 및 수태율을 산출한다. 또 모동물(P)의 암컷에 대해서는 분만의 이상 유무를 검색하고 출산율을 산출한다.

가) 교미율 = (교미동물수/동거동물수) × 100

나) 수태율 = (임신동물수/교미동물수) × 100

다) 출산율 = (출산어미수/임신어미수) × 100

(3) 차산자(F1) 이유시에 어미는 부검하고, 내부기관을 관찰한다.

(4) 차산자(F1)의 수컷, 그리고 교미, 임신, 출산을 하지 않은 암컷은 적절한 시기에 안락사하여 내부기관을 관찰한다. 수컷은 보통 교배기간이 끝났을 때 안락사한다. 암컷에 대해서는 교미가 되지 않은 것은 교배기간이 끝났을 때, 또 임신이나 출산이 안된 것은 교미일부터 계산해서 출산예정일을 2, 3일 경과한 때에 안락사한다.

5.3.2 차산자(F1)

(1) 태어난 차산자(F1)에 대해서는 출생 새끼수, 생사확인, 성별, 체중 및 외관의 변화 등을 조사한다.

(2) 출생 후는 일반상태, 사망의 유무, 성장 및 형태와 기능의 발달을 관찰 한다. 적어도 주 1 회 체중을 측정한다. 적당한 시기마다 생존율을 산출하고 이유시에 이유율을 산출한다.

가) 생존율 = (검사시의 생존새끼수/출산시의 새끼수, 생후 4일 또는 도태 직후의 생존 새끼수 또는 이유시의 생존새끼수)×100. 검색의 시기에 따라 분모가 다르다.

나) 이유율 = (이유시 생존새끼수/생 후 4일 또는 도태 직후의 생존새끼수) ×100

(3) 차차산자(F2)를 얻기 위한 교배용의 차산자(F1)에 대해서는 모동물(P)와 마찬가지로 검색을 하며, 나머지 차산자(F1)은 이유시에 부검한다.

5.3.3 차차산자(F2)

차산자(F1)과 동일한 방법으로 관찰을 하며, 원칙적으로 성 성숙기에 부검한다. 필요에 따라 조직학적 검사 또는 혈청 생화학적 검사를 한다. 조직병리 검사를 실시하는 장기는 다음과 같다.

- 모동물의 난소, 자궁, 경부, 질, 고환, 부고환, 정낭, 전립선, 응고선, 뇌하수체, 시험물질 영향이 관찰된 장기

5.4 그 밖의 필요한 사항

시험 중 사망한 동물에 대해서는 가능한 한 그 사인을 조사한다. 또 일반상태가 극히 불량하게 되어 죽음이 임박한 동물은 신속하게 희생·부검한다.

6. 시험결과 및 보고

6.1 결과의 처리

- (1) 관찰된 이상상태나 독성증상과 시험물질의 투여량과의 관계에 대해서는 적절한 통계학적 수법을 이용하여 고찰하고, 최대무영향용량에 대한 견해를 밝힌다. 이때, 한배에서 나온 새끼들을 표본단위로 한다.
- (2) 시험 결과는 우수비임상실험실(GLP)규정에 따라 작성하고 최종보고서를 첨부한다. 또한, 가능한 항목에 대해서는 적당한 통계적 수법을 이용하여 처리한다.

6.2 시험 결과의 보고

시험보고서는 다음의 항목을 포함한다.

- (1) 시험기관의 명칭 및 소재지
- (2) 시험책임자 및 담당자 성명
- (3) 시험동물: 종, 계통, 체중, 주령, 및 사용수
- (4) 선택용량에 대한 이론적 설명
- (5) 시험물질의 화학물질명 (IUPAC 또는 CAS번호), 물리적 특성, 안정성, 균질성, 적정성, 최종농도

KOSHA GUIDE
T - 21 - 2017

(6) 시험물질 투여방법

(7) 시험물질투여에 따른 독성반응자료

(8) 각 시험동물의 이상증후를 발견한 시간 및 이상증후

가) 실험기간동안 사망 일자

나) 비정상적 임상소견이 발견된 일자

(9) 사료 및 체중관련자료

(10) 각 동복 태아의 체중, 신생자의 평균체중 및 종료 시 신생자 개별 체중표

(11) 모동물(P) 체중의 성적

(12) 부검 및 조직병리학적 소견