KOSHA GUIDE

KOSHA GUIDE

KOSHA GUIDE

KOSHA GUIDE

KOSHA GUIDE 기술지원규정

화학물질에 의한 생체 외 포유류 세포의 유전자 돌연변이시험(Hprt 및 Xprt 유전자 변이)에 관한 기술지원규정

E-T-9-2026

한국산업안전보건공단

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

기술지원규정의 개요

○ 개정자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 흡입독성연구센터

○ 제·개정 경과
- 2018년 09월 12일 산업독성분야 제정위원회 심의
- 2025년 11월 보건·위생분야 전문위원회 심의(개정)
- 2026년 1월 표준제정위원회 본위원회 심의(개정)

○ 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 제105조(유해인자의 유해성·위험성평가 및 관리)
- 산업안전보건법 시행규칙 제142조(유해성·위험성 평가대상 선정기준 및 평가방법 등)
- 고용노동부 고시 제2023-9호(화학물질의 분류·표지 및 물질안전보건자료에 관한 기준)
- 국립환경과학원 고시 제2025-26호(화학물질의 시험방법에 관한 규정)
- 고용노동부예규 제203호(화학물질의 유해성·위험성 평가에 관한 규정)

○ 기술지침의 적용 및 문의
- 이 기술지원규정에 대한 의견 또는 문의는 산업안전포털 홈페이지(portal.kosha.or.kr)의 기술지원규정(KOSHA GUIDE) 소관 분야별 문의처 안내를 참고하시기 바랍니다.
- 동 규정 내에서 인용된 관련규격 및 자료, 법규 등에 관하여 최근 개정본이 있을 경우에는 해당 개정본의 내용을 참고하시기 바랍니다.

공표일자 : 2026년 1월 30일
제 정 자 : 한국산업안전보건공단 이사장

목 차

1. 목적 ····· 1

2. 적용범위 ····· 1

3. 용어의 정의 ····· 1

4. 시험 개요 ····· 2

4.1 고려사항 ····· 2

4.2 시험법의 원리 ····· 2

5. 시험 방법 ····· 3

6. 결과 처리 ····· 6

7. 시험결과의 보고 ····· 7

생체 외 포유류 세포의 유전자돌연변이시험 (Hprt 및 Xprt 유전자 변이)에 관한 기술지원규정

1. 목적

이 규정은 산업안전보건법, 동법 시행규칙, 고용노동부 고시 및 예규 등에 따라 화학물질 노출에 의해 발생할 가능성이 있는 건강장해에 관한 정보를 제공하기 위한 대체 시험법으로 화학물질의 유전자 변이원성에 대한 시험을 통해 화학물질 또는 혼합물의 특성을 평가하는 것을 목적으로 한다.

2. 적용범위

이 규정은 산업안전보건법, 동법 시행규칙, 고용노동부 고시 및 예규 등에 의거 Hprt 및 Xprt 유전자를 이용한 시험관내 포유류 세포 유전자 변이시험의 수행을 위한 시험방법 및 결과의 작성에 적용한다.

3. 용어의 정의

(1) 이 규정에서 사용하는 용어의 뜻은 다음과 같다.

(가) “Hprt” 및 “Xprt”란 성염색체인 X-염색체의 Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase gene 및 상염색체의 Xanthine-guanine phosphoribosyl transferase gene을 말한다.

(나) “전향 돌연변이(Forward mutation)”란 야생형(wild type) 유전자에 변이를 일으켜 전사 단백질의 활성 또는 기능을 상실 또는 변화시키는 돌연변이를 말한다.

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

(라) “틀이동 돌연변이원(Frameshift mutagens)”이란 DNA 분자에서 단일 혹은 여러 염기쌍의 삽입이나 결실을 유발하는 물질을 말한다.

(마) “돌연변이 빈도(Mutant frequency, MF)”란 측정된 돌연변이 세포 수를 살아있는 세포 수로 나눈 것을 말한다.

(바) “복제 효율(Cloning efficiency)"이란 배양접시에 저밀도로 분주된 세포 수 대비 셀 수 있는 콜로니의 생성 비율을 말한다.

(사) “상대 생존율(Relative survival, RS)”이란 음성대조군(100%)의 생존율을 나타냄) 대비 시험물질 처리군의 복제 효율을 말한다.

(2) 기타 이 규정에서 사용하는 용어의 정의는 특별한 규정이 있는 경우를 제외하고는 산업안전보건법령 및 관련 고시에서 정의하는 바에 의한다.

4. 시험 개요

4.1 고려사항

(1) 이 시험법은 생체 외 시험법으로 필요에 따라 외인성 대사활성계(S9 mix)를 사용하나, 이는 생체 내 조건을 완전히 모방하지는 않는다.

(2) pH 또는 삼투압의 변화, 배지 성분과의 상호작용 또는 과도한 수준의 세포독성 등의 과도한 시험 조건에 의해 시험물질과 세포의 유전물질 사이에 직접적인 상호작용에 기인하지 않는 인위적 양성 결과(즉, 시험계와의 가능한 상호작용)가 나타날 수 있다.

4.2 시험법의 원리

(1) 포유류 배양세포를 시험물질에 노출시킨 후 생체 외(in vitro) 시험조건에서 DNA 수준에서의 변화에 따른 돌연변이 여부를 측정하는 시험으로, 시험에 이용되는 세포주에서 X-염색체의 Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase gene (Hprt, HPRT) 또는 상염색체의 Xanthine-guanine phosphoribosyl transferase gene (Gpt, XPRT) 유전자의 전향 돌연변이를 측정한다. XPRT 시험법의 경우 HPRT 시험법에 의해 검출된 돌연변이 현상(염기쌍 치환, 해독틀 변화, 작은 결실 및 삽입) 이외에 큰 결실 및 유사분열 재조합으로 인한 돌연변이를 검출할 수 있다.

(2) 이들 세포는 Hprt 효소 또는 Xprt 효소가 결핍되어 정상세포와 달리 세포독성을 가진 6-Thioguanine (6-TG)을 유전자 합성에 사용하지 않아 세포독성을 나타내지 않는다.

(3) 시험물질에 의해 위의 효소에 돌연변이가 나타나는 경우는 6-TG가 유전자 합성에 사용되어 세포독성이 나타나므로 배양세포의 생장 정도를 측정하여 돌연변이 빈도를 계산할 수 있다.

5. 시험 방법

(1) 시험 세포

(가) HPRT 및 XPRT 시험에 사용되는 세포는 화학적 돌연변이 유발물질에 대한 민감성, 높은 복제 효율, 안정된 핵형 및 자연발생 돌연변이 빈도가 입증된 세포주여야 한다. 일반적으로 HPRT 시험은 CHO, CH, V79, L5178Y, TK6 세포주가 사용되며, XPRT 시험에는 AS52 세포주를 사용한다.

(나) 세포주는 염색체 수의 안정성 및 마이코플라즈마 오염이 없음을 확인해야 하며, 감염되었거나 염색체 수가 불안정한 경우 세포를 사용할 수 없다.

(2) 배지 및 배양 조건

배양 유지를 위해 시험 세포에 따라 적절한 배지 및 조건(배양 용기, 이산화탄소 농도, 습도 등)을 사용하며, 배양 조건은 세포의 생장률이 최적이 되도록 하여, 돌연변이 또는 비돌연변이 세포들이 콜로니를 형성하는데 적합하도록 한다.

(3) 배양 준비

세포는 보관 세포주로부터 배양한 후 과밀하지 않고 기하급수적으로 자랄 수 있도록 유지되어야 한다.

(4) 대사활성화

(가) 내인성 대사능력이 부족한 세포에는 외인성 대사활성계(S9 mix)를 사용하며, 대사활성계는 효소유도물질(Aroclor 1254 또는 phenobarbitone과 ß-naphthoflavone의 혼합물)을 처리한 설치류의 간으로부터 분리한 S9 분획을 사용한다.

(나) 채택된 외인성 대사활성화계 또는 대사 유도제의 유형과 농도의 선택은 시험물질에 따라 달라지는데, S9 분획은 1% ~ 2%(v/v)의 농도로 사용되지만 최종 시험 배지에서 10%(v/v)까지 늘릴 수 있다.

(5) 시험물질의 준비

(가) 고체 시험물질은 용매 또는 용제에 용해시키거나 현탁액으로 만들어 사용하며, 적절하게 희석시킨 후 세포에 처리한다. 액체 시험물질은 시험계에 직접 처리하거나 희석하여 사용하며, 가스 또는 증기 형태의 시험물질은 봉입된 배양관 내 처리 등의 변형 방법을 사용한다.

(나) 시험물질의 안정성 자료가 없는 경우 시험 직전에 시험물질을 조제한다.

(6) 시험조건

(가) 용매

용매는 시험에 영향을 주지 않고 시험물질의 용해도를 최적화 할 수 있는 것으로 선택한다. 가능한 수용성 용매를 사용하고 최종 시험 배지의 10%(v/v)를 넘지 않으며, 유기용매는 1%(v/v)를 넘지 않도록 한다. 잘 알려진 용매나 매개물질 외 다른 물질을 사용할 경우 사용 농도에서 시험물질 및 시험계와의 상용성 및 유전독성의 부재를 나타내는 자료를 제시해야 한다.

(나) 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 투여군은 최소한 4 개 이상의 농도를 설정하며, 농도 범위는 세포의 치사율이 나타나는 독성발현 농도에서 독성이 나타나지 않는 농도를 포함한다.

④ 최대농도가 세포독성에 근거한 경우, 가장 높은 농도는 10%~20% RS를 달성하는 것을 목표로 해야 한다.

⑤ 세포독성이 거의 없는 시험물질의 경우 최고 농도가 10 mM, 2 mg/mL 또는 2 uL/mL 중 가장 낮은 것으로 하고 불특정 혼합물질의 경우 5 mg/mL 로 할 수 있다.

(다) 대조군

① 음성대조군은 용매만으로 구성되고 처리 배양과 동일한 방식으로 처리되는 동시에 모든 실험조건에 포함되어야 한다.

② 양성대조군은 모든 실험조건에 포함되어야 하며, 대사활성계의 유무에 따라 사용한다.

③ 양성대조군의 예를 <표 1>에 제시했으며, 타당한 경우 다른 양성대조물질을 사용할 수 있다.

<표 1> 대표적인 양성 대조물질

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]

(라) 시험물질 처리

① 증식하는 세포는 대사활성화계의 존재 또는 부재 시 시험물질로 처리되며, 노출시간은 적절해야 한다(보통 3 ~ 6 시간이 적당).

② 시험의 모든 단계(처리, 표현형 발현 및 돌연변이 선별)에서 적어도 10개 이상, 이상적으로는 100개의 자발적 돌연변이를 유지하여야 한다. 돌연변이 빈도는 일반적으로 $5 \times 10^{-6} \sim 20 \times 10^{-6}$ 사이이다.

(마) 표현형 발현 시간 및 돌연변이 측정 빈도

① 처리 후, 최소 7 ~ 9일 간 세포를 배양하여 유전자 변형이 게놈 내에서 고정되고 기존 유전자 산물의 표현형 특성이 변형(돌연변이 표현형의 발현)되는 시점까지 고갈되는 기간을 표현형 발현 시간으로 한다.

② 이 기간 동안 세포는 기하급수적인 성장을 유지하기 위해 정기적으로 계대배양 한다.

③ 표현형 발현 후 세포는 선택제(6-TG)의 유무에 따라 배지에 세포를 재분주하고 콜로니가 성장할 수 있도록 7 ~ 12일 동안 배양한 후 돌연변이의 수를 측정하고 복제 효율을 측정한다.

6. 결과 처리

(1) 결과의 표시

결과의 제시는 세포독성(RS로 표현)을 계산하는데 필요한 모든 자료를 포함해야 하며, 시험결과는 아래의 방법으로 대조군 및 처리군 모두에서 세포독성, 상대 생존율, 돌연변이 빈도를 계산하여 표로 정리한다.

(가) 복제 효율 = 콜로니 수 / 배양 접시에 분주한 세포 수

(나) 상대 생존율 = (시험물질 처리군의 보정된 복제 효율 / 음성 대조군의 보정된 복제 효율) × 100 %

(다) 돌연변이 빈도 = 6-TG이 첨가된 배지에서 관찰된 돌연변이 콜로니의 복제 효율 / 6-thioguanine이 첨가되지 않은 배지에서 복제 효율

(2) 결과 평가 및 해석

(가) 어느 한 농도에서 음성대조군과 비교하여 유의한 증가를 보이거나, 결과 값이 음성 대조군의 범위를 넘으면 양성으로 판단한다. 음성대조군과 비교하여 어느 농도에서도

유의적인 증가가 나타나지 않고, 농도 의존적 증가가 없으며, 모든 결과 값이 음성대조군의 범위내에 있으면 음성으로 판단한다.

(나) 대부분의 시험에서는 시험물질이 유전자 돌연변이에 대해 양성 또는 음성을 나타내지만, 일부 물질의 경우 재시험을 반복하더라도 애매하거나 불분명한 결과를 나타낼 수 있다. 이때에는 적절한 사유와 타당성을 가지고 의양성으로 판정한다

7. 시험결과의 보고

시험보고서에는 다음 정보가 포함되어야 한다.

(1) 시험기관의 명칭 및 소재지

(2) 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

(3) 시험물질 정보

(가) 화학물질의 명칭(CAS 번호, 일반명, 상품명 명기)

(나) 공급처, 로트 번호, 사용기한

(다) 시험물질의 안정성, 용해도

(4) 용매 및 매개물질(vehicle) 정보

(가) 용매 및 매개물질 선정 근거

(나) 최종 배양 배지 내 용매의 백분율

(5) 사용 세포 정보

(가) 세포 명, 형태 및 공급원

(나) 계대배양 수 및 가능한 경우 계대 이력

(다) 핵형 특성 및 염색체의 수

(라) 세포 배양 방법 및 세포 배가시간

(마) 마이크로플라스마의 부재 여부

(6) 시험조건

(가) 시험농도, 배양 균주 수 등의 설정에 대한 근거

(나) 배양배지 조성 및 이산화탄소 농도, 습도

(다) 최종 시험물질 농도, 배지 내 용매 농도

(라) 배양 시간 및 온도

(마) 시험물질의 처치 기간, 처치 중의 세포 밀도, 발현 기간

(바) 대사활성계의 형태 및 구성

(사) 양성대조군 및 음성대조군, 각각의 최종 농도

(아) 선택물질(selective agents)과 농도

(자) 시험 성립 조건

(차) 생존 세포 및 돌연변이 세포 수의 계산법, 세포독성 측정 방법 및 관련 정보

(카) pH, 삼투압 측정에 사용된 방법 및 침전 상태

(타) 판정 기준

(7) 시험결과

(가) 시험물질을 처리한 세포 수와 계대 배양된 세포 수

(나) 세포 독성 측정 및 다른 관찰 결과

(다) 침전 여부 및 측정 시간

(라) 선택 및 비선택 배지 내의 세포 수, 비선택 배지의 콜로니 수, 선택 배지의 저항성 콜로니 수, 돌연변이 빈도

(마) 용량-반응 관계(가능한 경우)

(바) 음성대조군(용매 및 매개물질) 및 양성대조군의 결과

(사) 통계적 분석 및 p-value

(아) 시험 결과에 대한 고찰 및 결론

기술지원규정 개정 이력

□ 개정일 : 2026. 1. 30.

○ 개정자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 흡입독성연구센터

○ 개정 사유 : 법, 규정 개정에 따른 지침의 최신화 등

관리번호	기술지원규정명	정비유형
E-T-9-2026	화학물질에 의한 생체 외 포유류 세포의 유전자 돌연변이시험(Hprt 및 Xprt 유전자 변이)에 관한 기술지원규정	통폐합(개정)
T-29-2018	화학물질에 의한 시험관내 포유류 세포의 Hprt 및 Xprt 유전자 변이시험 지침	통폐합(폐지)
T-8-2018	화학물질의 시험관내 포유류 세포 유전자 돌연변이 시험지침	

○ 주요 개정내용

- 산업안전보건법 개정에 따른 법 조항, 문구 등 수정
- 기존 고용노동부 고시 폐지에 따라 국립환경과학원고시 제2020-46호(화학물질의 시험방법에 관한 규정)를 따른 용어 및 내용의 변경
- 유사 내용의 기술지침 통폐합

KOSHA GUIDE
기술지원규정

·규정번호 : E-T-9-2026
·심　　의 : 산업안전보건표준제정위원회
·공 표 일 : 2026. 1. 30.