

KOSHA GUIDE

T - 19 - 2020

화학물질의 고정용량법에 의한 급성경구독성시험  
기술지침

2020. 12.

한국산업안전보건공단

## 안전보건기술지침의 개요

- 작성자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 이 용 훈
- 개정자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 이 성 배
  
- 제·개정 경과
  - 2015년 11월 산업독성분야 기준제정위원회 심의(제정)
  - 2016년 10월 산업독성분야 기준제정위원회 심의(개정)
  - 2017년 9월 산업독성분야 기준제정위원회 심의(개정)
  - 2019년 11월 산업독성분야 기준제정위원회 심의(개정)
  - 2020년 12월 산업독성분야 기준제정위원회 심의(개정)
  
- 관련규격 및 자료
  - OECD Guideline for testing of chemicals(TG 420, Acute oral toxicity-Fixed dose procedure)(2001)
  
- 관련법규·규칙·고시 등
  - 산업안전보건법 제104조(유해인자의 분류기준)
  - 산업안전보건법 제105조(유해인자의 유해성·위험성 평가 및 관리)
  - 산업안전보건법 시행규칙 제141조(유해인자의 분류기준) 별표 18
  - 국립환경과학원 고시(화학물질의 시험방법에 관한 규정)
  
- 기술지침의 적용 및 문의
  - 이 기술지침에 대한 의견 또는 문의는 한국산업안전보건공단 홈페이지([www.kosha.or.kr](http://www.kosha.or.kr))의 안전보건기술지침 소관 분야별 문의처 안내를 참고하시기 바랍니다.
  - 동 지침 내에서 인용된 관련규칙 및 자료, 법규 등에 관하여 최근 개정본이 있을 경우에는 해당 개정본의 내용을 참고하시기 바랍니다.

공표일자 : 2020년 12월

제 정 자 : 한국산업안전보건공단 이사장

# 화학물질의 고정용량법에 의한 급성경구독성시험 기술지침

## 1. 목 적

이 지침은 「산업안전보건법」 제39조(유해인자의 관리 등), 제40조(화학물질의 유해성·위험성 조사), 국립환경과학원고시(화학물질의 시험방법에 관한 규정)에 따라 급성경구독성시험 항목에 대한 최신 시험법 (고정등급법)을 제시하여 시험동물의 사용수를 줄이고 윤리적인 동물실험을 수행하기 위함이다.

## 2. 적용범위

이 지침은 화학물질의 노출에 의한 급성 영향 및 건강장해에 관한 독성시험에 적용한다.

## 3. 용어의 정의

(1) 이 지침에서 사용되는 용어의 정의는 다음과 같다.

(가) "급성경구독성"이라 함은 시험물질을 24시간 이내에 1회 또는 수회 경구투여한 후 단시간 내에 나타나는 유해영향(Adverse effects)을 말한다.

(나) "투여량(Dose)"이라 함은 투여하는 시험물질의 양을 말한다. 일반적으로 단위는 시험동물의 체중 당 시험물질의 무게(예, mg/kg)로 표시한다.

(다) "빈사 상태(Moribund state)"라 함은 시험물질의 독성에 의하여 시험동물이 죽어가는 상태 또는 생존할 가망이 없는 상태를 말한다.

(라) "GLP(Good Laboratory Practice)"이라 함은 유해위험성 실험실운영규정을 말한다.

(마) "GHS(Globally Harmonized Classification System for Chemical Substances and Mixtures)"이라 함은 화학물질 분류 및 표지의 세계조화시스템을 말한다.

(2) 그 밖의 용어의 뜻은 이 지침에서 특별히 규정하는 경우를 제외하고는 산업안전보건법, 같은 법 시행령, 같은 법 시행규칙, 안전보건규칙에서 정하는 바에 의한다.

## 4. 시험계획서 작성

### 4.1 목적

독성등급법에 의한 급성경구독성시험을 실시하기 위하여 시험계획서를 작성한다.

### 4.2 시험계획서 작성 시기

(가) 시험책임자는 운영책임자로부터 시험책임자로 지정되면 시험물질의 조제 등에 관한 자료를 확보하고 시험계획서를 작성한다.

(나) 시험책임자는 시험계획서가 운영책임자에 의하여 승인되면, 실험동물윤리위원회심의 및 동물구입 신청이 원활히 이루어 질 수 있도록 한다.

### 4.2 시험계획서 작성방법

시험계획서에는 표지 및 시험개요, 시험세부계획이 포함되도록 한다.

(가) 표지 및 시험개요

표지 및 시험개요에는 시험번호, 시험명, 작성일, 시험일정, 의뢰기관, 시험기관명, 각 시험부문별 확인 및 승인사항이 나타나도록 한다.

(나) 시험세부계획

시험세부계획에는 1. 시험목적, 2. 적용된 시험방법, 3. 사용된 시험계, 4. 동물사육 환경, 5. 사료, 6. 음용수, 7. 시험물질 및 매체대조물질 8. 투여방법. 9. 시험항목, 10.

통계처리, 11. 보관될 기록 및 자료, 12. GLP 대응 및 신뢰성 보증, 13 참고문헌, 14. 첨부자료 등으로 구성한다.

## 5. 독성시험 수행

시험책임자는 작성된 시험계획서에 따라 다음과 같이 독성시험을 수행한다.

### 5.1 시험의 준비

#### 5.1.1 동물입수 준비

- (1) 시험책임자는 동물관리자와 협의하여 사용할 동물실을 결정한다.
- (2) 동물관리책임자는 사용할 동물실의 환경, 청소 소독, 설비를 점검하고 이상이 없도록 준비한다.
- (3) 사용할 기자재가 완전히 갖추어 진 것을 확인한다.
- (4) 개체식별카드는 미리 작성하여 사육상자 전면에 부착한다.
- (5) 동물실 사용기록지를 작성하여 사용할 동물실의 전면에 부착한다.

#### 5.1.2 실험동물

- (1) 연령이 8~12 주령 된 시험용 랫드(다른 설치류도 가능)를 사용하며 개체 간 체중 차이는 평균체중의  $\pm 20\%$ 를 넘지 않도록 한다.
- (2) 시험은 한쪽 성을 사용하는데 암컷을 사용하는 것을 원칙으로 하며, 수컷을 사용할 경우 타당한 사유를 제시한다.
- (3) 암컷은 과거에 새끼를 낳은 적이 없고 현재 임신 중이지 않은 것을 사용한다.
- (4) 시험에 사용할 개체는 시험 시작 전 최소 5 일 이상 실험실에서 순화시킨 건강한 동물 중에서 무작위로 선정한다.

### 5.1.3 사육조건

- (1) 사육실은 온도가  $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ , 습도가 30~70%가 유지되도록 한다.
- (2) 사육은 암·수를 구별하여 실시하며 각 개체의 상태 관찰이 용이하도록 밀도가 높지 않도록 한다.
- (3) 조명은 인공조명으로 연속 12시간 간격으로 점등한다.
- (4) 사료는 물과 함께 일반 실험용 사료를 공급한다.

### 5.1.4 시험물질

- (1) 시험물질은 적당한 용매에 용해 또는 현탁시킨다. 시험물질은 수용성 액이 우선적으로 권장되나, 비수용성인 물질의 경우 오일(예, corn oil) 또는 기타 다른 용매를 사용한다.
- (2) 이때 사용하는 용매는 사전에 독성 여부와 특성이 잘 알려진 것을 사용한다.

## 5.2 시험방법

### 5.2.1 원리

- (1) 예비시험에서는 단일 성(가능한 암컷을 우선으로 함)의 동물을 사용하여 최소 치사량 및 용량-반응 관계 자료를 확보한다. 그리고는 본시험에서는 단일 성(가능한 암컷을 우선으로 함)의 동물을 사용하여 고정용량(5, 50, 300, 2,000 mg/kg) 대해 단계적으로 시험한다.
- (2) 시작 용량은 기존의 독성자료에 근거하여 선정하는데 사망과 같은 심각한 독성을 유발하지 않으나 그 외의 독성 증상이 관찰될 수 있을 것으로 예측되는 용량으로 한다.
- (3) 시작 용량의 경과에 따라 다음 용량을 결정한 후 단계적으로 투여한다.

### 5.2.2 시험물질의 투여

- (1) 경구 투여하는 시험물질의 양은 실험동물의 크기에 따라 다르나, 일반적으로 최대 1 ml/100 g(체중)을 넘지 않도록 한다. 다만, 수용액의 경우는 2 ml/100 g까지 허용한다.
- (2) 투여는 1 회 투여를 원칙으로 하되 불가능할 경우 소량씩 나누어 실시하며, 투여 간격은 24 시간이 넘지 않도록 한다.
- (3) 시험물질을 투여하기 전날 저녁부터 물을 제외한 먹이 공급을 중단하고 체중을 측정한다(마우스의 경우는 투여 전 3~4 시간 전부터 먹이 공급 중단).
- (4) 시험물질의 경구투여 후 3~4 시간 후(마우스의 경우는 1~2 시간 후)부터 먹이를 공급한다.
- (5) 시험물질을 소량씩 나누어 투여할 경우, 투여 간격을 고려하여 소량씩 여러 번 물과 먹이를 적절히 제공한다.

### 5.2.3 예비시험

- (1) 시험물질 투여 후 적어도 14일 동안 관찰한다.
- (2) 예비시험의 시작 용량은 독성 증상을 관찰할 수 있을 것으로 예측되는 용량으로써 고정용량(5, 50, 300, 2,000 mg/kg) 가운데 하나를 선택하여 한 마리씩 투여하고, 이때 나타난 결과를 통해 다른 농도에서 예비시험을 실시하거나 본 시험의 농도를 설정한다. 예비시험의 농도 선정은 시험물질 또는 시험물질과 관련이 있는 물질의 독성자료를 바탕으로 한다.
- (3) 시작 용량을 선정하기 위해서 해당 물질 또는 유사 물질의 독성정보가 없는 경우 처음에 300 mg/kg 용량으로 시작한다.
- (4) 만일 2,000 mg/kg 이상의 농도에서 시험동물이 사망하지 않는 경우 예비시험을 중단하고 본시험을 2,000 mg/kg에서 실시한다. 만일, 최소 고정용량인 5 mg/kg에서 처음 투여한 1 마리의 동물이 사망하면 시험을 중단하고 GHS 카테고리 1로 분류한다. 이때 이를 확실히 검증하려면 보완적인 시험도 실시하는데 이는 시험

자가 선택적으로 실시한다.

- (5) 보완시험의 경우, 두 번째 동물에 5 mg/kg을 투여하며, 이때 동물이 사망하면 GHS 카테고리 1 분류를 확정한다. 만약 생존할 경우 추가로 1 마리씩 일정한 시간 간격(앞서 투여한 동물의 생존이 확인된 후)을 두고 총 3마리를 5 mg/kg 용량으로 투여한다. 이때 2 마리 이상 사망할 경우 GHS 카테고리 1로 분류하며, 1 마리 이하 사망 시 카테고리 2로 분류한다(그림 1 참조).
- (6) 동물복지를 위하여 5,000 mg/kg 용량시험은 권장되고 있지 않으나, 필요하다고 판단될 때는 수행할 수 있으며, 이 경우에는 적정 사유를 언급하여야 한다.

#### 5.2.4 본시험

- (1) 각 시험용량에 대해 단일 성(암컷을 우선으로 함)인 5 마리를 시험동물로 사용한다. 이때 예비시험에 사용된 동물 1 마리를 5 마리에 포함시켜 결과를 산출하도록 한다(예비투여에서의 투여 용량이 본시험과 다른 경우는 제외).
- (2) 예비시험의 결과를 토대로 설정한 용량을 시험동물에 투여하며 이때 나타난 독성반응에 따라 카테고리를 분류한다.
- (3) 관찰기간은 일반적으로 14 일 실시하는데 관찰기간은 고정적이지는 않으며 독성반응, 속도, 회복기간 등에 따라 변경될 수 있다.
- (4) 관찰은 투여 후 30 분 이내에 적어도 한번 관찰하고, 특히 투여 후 처음 4 시간은 특별한 주의를 기울여 관찰하도록 한다. 이후 14 일까지 적어도 1회 이상 관찰한다.
- (5) 한계시험은 시험물질이 무독성일 가능성이 있을 때 수행될 수 있다. 2,000 mg/kg (특별한 경우 5,000 mg/kg)으로 시작되는 예비시험을 거친 후 동일 용량으로 추가 4 마리에 대해서 본 시험의 절차에 따라 수행한다(그림 2 참조).
- (6) 시험물질의 투여 후 시험동물의 증상(사망 또는 빈사상태)이 명확히 관찰된 경우, 다음 시험단계로 진행한다. 빈사 상태의 동물은 안락사 시킨다.
- (7) 독성 증상이 나타나기 시작한 시간과 소멸되기 시작한 시간은 매우 중요하므로



모든 관찰은 체계적으로 기록되어야 하며, 개체별로 기록하여야 한다.

- (8) 관찰은 피부 및 털, 눈 및 점막, 호흡계, 순환계, 자율 및 중추신경계, 행동 유형을 포함한다. 특히 경련, 설사, 유연, 혼수상태 등의 증상은 유의하여 관찰한다.
- (9) 체중은 시험물질 투여 직전과 종료 후 부검 직전 측정하며, 시험기간 중에는 주 1 회 측정을 원칙으로 하는데 이때 체중 변화를 계산하여 반드시 기록하도록 한다.
- (10) 시험 중 사망 및 빈사동물을 포함하여 모든 시험동물은 부검 후 소견을 기록한다. 필요시 부검 후 조직병리학적 관찰을 통한 소견을 기록한다.

#### 5.2.5 시험상의 유의사항

- (1) 부식성이나 자극성이 큰 물질의 경우 시험동물에 고통을 주므로 되도록 시험을 피하도록 한다.
- (2) 시작농도 선택에 신중을 기함으로써 시험동물의 수를 가능한 최소화 하여야 한다.
- (3) 시험동물이 참기 힘들 정도로 고통스러워할 경우 안락사 시키며 시험 중 사망한 동물로 처리한다.

## 6. 독성시험결과 및 보고

### 6.1 결과의 처리

시험용량, 시험동물 수, 독성증상을 보이는 시험동물 수, 시험기간 중 치사동물 수, 독성발현 및 시간, 용량-독성반응 관계, 부검결과 등을 기록한다.

### 6.2 시험결과의 보고

시험보고서는 다음의 항목을 포함한다.

(1) 시험기관의 명칭 및 소재지

(2) 시험책임자 및 담당자 성명

(3) 시험동물 : 종, 시험동물의 수, 연령, 공급원, 사육조건, 각 개체의 사육 조건

(4) 시험물질 : 물질명과 CAS 번호, 물리적 특성 및 순도, 시험과 관련된 물리화학적 특성, 시험물질의 안정성

(5) 시험용매명 및 선정사유

(6) 시험조건 : 시험기간, 투여용량 수준 및 횟수, 먹이공급 시기

(7) 시험결과

(가) 용량별 독성반응 결과 : 사용 동물수, 체중변화, 사망 및 도살 동물수, 독성증상을 보이는 동물 수, 피부, 털, 눈, 점막, 소화계, 호흡계, 순환계, 중추신경계에 나타나는 독성증상(행동유형, 경련, 설사, 유연, 혼수상태 등)

(나) 독성증상을 보이는 시간 및 회복 시간

(다) 도살기준 및 근거

(라) 부검 결과

(마) 결과의 해석

## &lt;부록 1&gt; 예비시험 단계의 흐름도(1), (2)

그림 1. 예비시험 단계의 흐름도 (1)

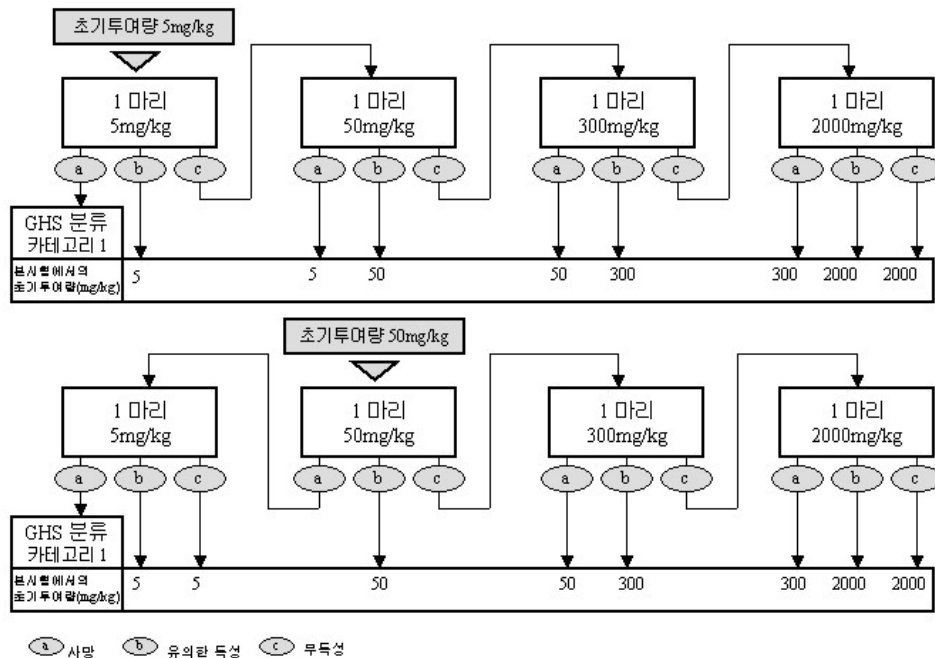
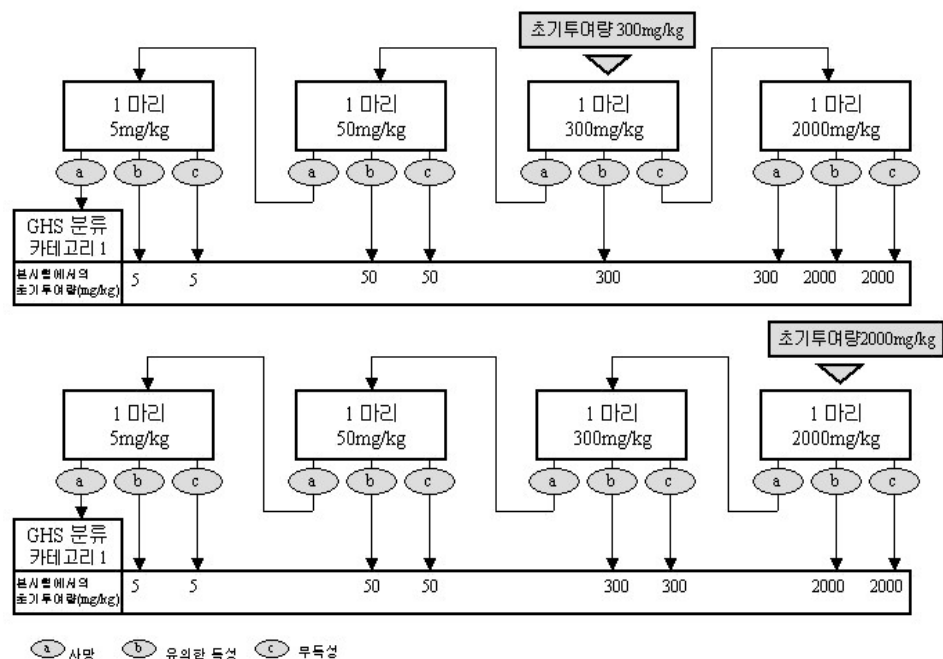


그림 1. 예비시험 단계의 흐름도 (2)



## &lt;부록 2&gt; 본시험 단계의 흐름도(1), (2)

그림 2. 본시험 단계의 흐름도 (1)

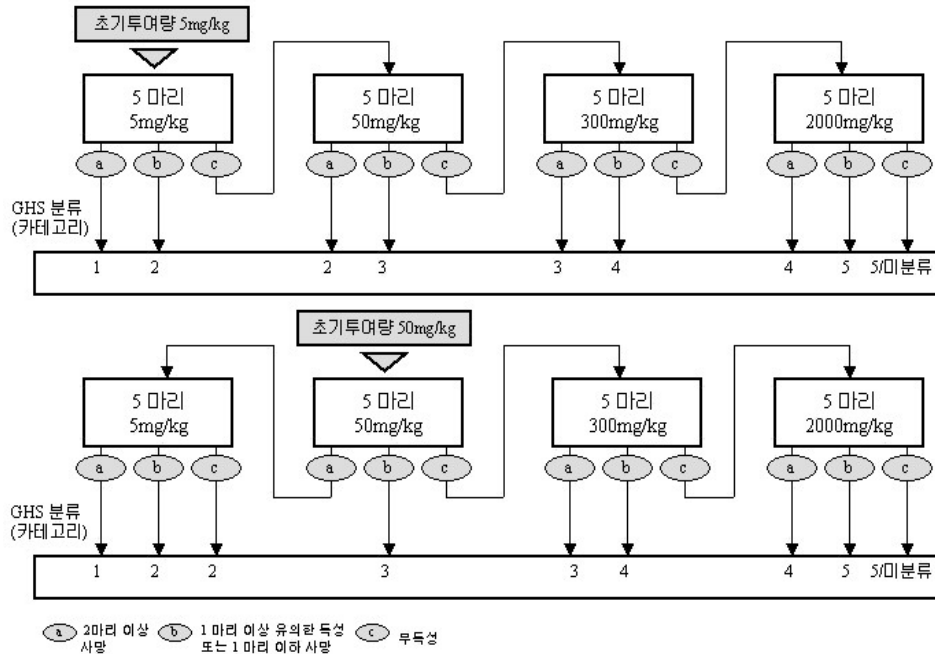


그림 2. 본시험 단계의 흐름도 (2)

