

KOSHA GUIDE

T - 9 - 2016

생체시료 중 석면소체 및 석면섬유
분석지침

2016. 10

한국산업안전보건공단

안전보건기술지침의 개요

- 작성자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 한정희
- 개정자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 권부현

- 제·개정 경과
 - 2013년 11월 산업독성분야 제정위원회 심의
 - 2016년 10월 산업독성분야 제정위원회 심의(개정)

- 관련규격 및 자료
 - 일본 노동자건강복지기구-환경재생보건기구. 석면소체계측매뉴얼 제2판, 2011
 - NIOSH Manual of Analytical Methods 7400 『Asbestos and other fibers by PCM』

- 관련법규, 규칙, 고시 등
 - 산업안전보건법 제43조(건강진단)
 - 산업재해보상보험법 시행령 제34조(업무상 질병의 인정기준)
 - 산업안전보건법 시행규칙 제100조(검사항목 및 실시방법)

- 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 : 2016년 10월 31일

제 정 자 : 한국산업안전보건공단 이사장

생체시료 중 석면소체 및 석면섬유 분석지침

1. 목 적

이 지침은 「산업안전보건법 시행규칙」 제100조(검사항목 및 실시방법)에 따라, 생체시료 중 석면함유 여부 및 농도를 측정하기 위한 시료채취 및 분석방법 제시를 목적으로 한다.

2. 적용범위

이 지침은 산업안전보건법 제43조 (건강진단) 및 산업재해보상보험법 시행령 제34조 (업무상 질병의 인정기준)에서 정한 석면으로 인한 업무상 질병의 판정에 적용한다.

3. 용어의 정의

- (1) “섬유(fiber)”란 길이와 직경의 비가 3 : 1 이상인 입자상 물질을 말한다.
- (2) “석면(asbestos)”이란 길고, 얇고, 유연하며 강한 섬유로 쉽게 분리되는 석면형(asbestiform)으로 결정화한 사문석계 또는 각섬석계 규산염 광물로서 종류(CAS No.)는 백석면(chrysotile, 12001-29-5), 갈석면(amosite, 12001-28-4), 청석면(crocidolite, 12172-73-5), 트레모라이트석면(tremolite, 77536-68-6), 악티노라이트석면(actinolite, 77536-66-4), 안소필라이트석면(anthophyllite, 77536-67-5)이다.
- (3) “석면섬유(asbestos fiber)”란 길이와 직경의 비가 3:1 이상이며 길이가 5 μm 이상의 섬유 모양을 가지고 있는 석면을 말한다.
- (4) “석면소체(asbestos body)”란 폐내에 흡입된 석면섬유가 생체내 대식세포에 의해 탐식되어 오랜 기간 동안 단백질 물질을 흡착하여 형성된 것을 말한다.

4. 시약 및 기구

4.1 기구

- (1) 위상차현미경(phase contrast microscope; PCM) : 대안렌즈(10×), 대물렌즈(40~45×), 구경수차(numerical aperture; 0.65~0.75)를 사용한다.
- (2) 현미경 계수자 : 직경 100 μm 의 원형시야(시야면적 0.00785 mm^2)를 가진 Walton-Beckett graticule(type G-22)을 사용한다.
- (3) 스테이지마이크로미터(stage micrometer) : 눈금간격 0.01 mm
- (4) 아세톤 증기화 장치(condensation washer) : 아세톤을 가열하여 아세톤 증기를 발생시키는 장치로 상용화된 장치를 사용할 수 있다.
- (5) 전자저울 (balance) : 0.01 mg~100 g 측정가능
- (6) 흡인여과기(aspirator) : 25 mm 필터용
- (7) 원심분리기(centrifuge) : 50 ml 원심분리관을 사용가능하며 3,000 rpm 이상의 회전수로 작동 가능한 것
- (8) 건조기(dry oven) : 40~60℃의 온도설정 가능한 것
- (9) 초음파분산기(ultrasonicator)
- (10) 시험관교반기(vortex mixer)
- (11) 원심분리관 : 폴리에틸렌 또는 유리재질로 마개가 있는 것
- (12) 유리병(vial) : 유리재질로 마개가 있는 것
- (13) 비이커(conical beaker) : 50~100 ml
- (14) 마이크로피펫(micropipet) : 5~500 μl
- (15) 페트리디쉬(petri dish) : 직경 100 mm
- (16) 필터(filter) : 직경 25 mm, 공극 0.8 μm 또는 0.45 μm 의 셀룰로오스에스테르멤브레인(mixed cellulose ester membrane; MCE) 필터를 사용한다.
- (17) 칼(scalpel) : 외과용 메스, # 10
- (18) 주사기(syringe)
- (19) 슬라이드글라스(slide glass) : 표준형×75 mm
- (20) 커버글라스(cover glass) : 22×22 mm
- (21) 계수기(counter)
- (22) 기타 메스실린더(mess cylinder), 주사기(syringe), 여과지(filter paper), 알루미늄 호일(aluminum foil)

4.2 시약

- (1) 조직소화액 : 20% 차아염소산나트륨(sodium hypochlorite) 또는 5% 수산화칼륨(KOH)을 사용한다. 또한 이를 함유한 세제 등도 사용할 수 있다.
- (2) 아세톤(acetone) : 특급 또는 1급 시약
- (3) 트리아세틴(triacetin) : 굴절을 1.434. 기타 굴절율이 1.5 이하의 봉입제로 트리아세틴 봉입표본과 비교하여 섬유의 시인성에 차이가 없으면 사용가능하다.
- (4) 크실렌(xylene) : 특급 또는 1급 시약
- (5) 에탄올(ethanol) : 특급 또는 1급 시약

5. 시료의 준비

5.1 시료의 종류

(1) 폐실질 조직

석면노출수준을 평가하기 위하여 석면소체를 계수할 경우 종양부를 제외한 일정량 이상의 폐실질 조직을 사용한다. 폐실질 조직 이외의 종양부, 림프절, 흉막(흉막반 포함)의 조직에 함유된 석면소체에 대해서는 폐실질조직과 같은 평가방법이 확립되어 있지 않기 때문에 노출평가에 부적합하다.

(2) 시료의 보존형태

(가) 포르말린 고정조직 : 폐조직을 중성완충포르말린에 고정한다.

(나) 파라핀 포매조직 : 폐조직을 파라핀에 고정한 것으로 0.2~0.3 cm 이상(건조중량 0.05 g 이상)의 조직이 필요하다.

5.2 시료의 채취

(1) 부검 폐

폐의 좌우 각 엽에서 폐벽측에 가까운 부분의 실질조직을 약 5 부위 정도 채취하는 것이 좋다. 0.5~1 g 정도로 같은 양을 1 개의 시료로 취급한다. 1 부위를 채취할 경우 하부의 말단조직에서 2~5 g 정도 채취한다.

(2) 수술절제 폐

하부의 말단조직에서 2~5 g 정도 채취한다.

(3) 파라핀 포매 폐

포매한 조직절편을 수 mm로 잘라 크실렌에 24시간 이상 두어 탈파라핀을 한 후 에탄올로 세정한다.

6. 시료의 제작 및 분석방법

(1) 시료의 세 절

채취한 조직은 기관지와 혈관부분을 피하여, 정상 폐실질조직을 메스를 이용하여 수 mm 크기로 잘게 자른다.

(2) 시료의 중량 측정

시료를 건조기로 110℃에서 2~4시간 건조한 후 중량을 측정한다.

6.1 시료의 제작

(1) 건조한 시료를 50 ml 원심분리관에 넣어, 조직소화액 30 ml를 가한다. 시료의 양이 2 g이 넘으면 소화액의 양을 습중량 1 g에 15 ml를 기준으로 늘인다.

(2) 마개를 덮은 원심분리관을 60℃ 건조기에서 수 시간 정도 두어 조직덩어리가 완전히 없어질 때까지 소화한다.

(3) 소화한 시료를 3,000 rpm에서 30분간 원심분리한 후 피펫을 사용하여 상층액을 제거한다. 남은 침전물이 많을 경우 1~2 회 소화처리를 반복한다.

(4) 원심분리관에 증류수 30 ml를 넣고 초음파분산기를 사용하여 1분 정도 분산하고 교반기로 교반하여 침전물을 골고루 분산한다. 다시 원심분리하여 상층액을 제거한 후 이러한 세정작업을 3회 반복한다.

(5) 세정작업 후, 50 ml 유리병에 원심분리관의 내용물을 모두 옮기고, 증류수를 넣어 50 ml가 되게 한다.

(6) 유리병안에 현탁액을 교반하여 균질하게 분산한 후, 피펫으로 1~20 ml로 적당량을 나누어, 50 ml 비이커로 옮긴다.

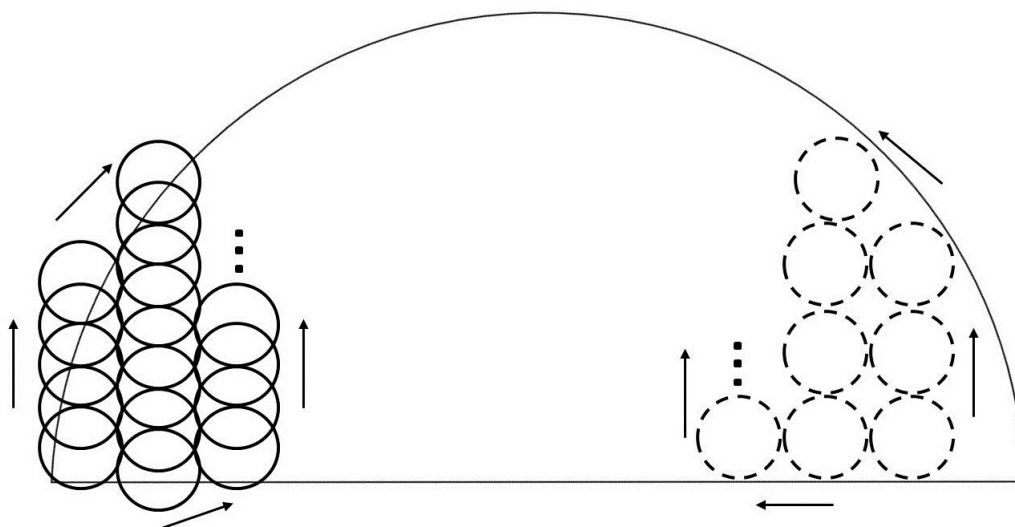
(7) 비이커에 증류수 20~40 ml를 넣고 회석하여, 전량을 흡인여과기에 장착된 필터를 통하여 여과한다.

- (8) 여과한 필터를 페트리디쉬로 옮겨 오염이 되지 않도록 실온에서 건조하거나 40℃ 전후의 건조기에서 2시간 이상 건조한 후 메스로 반으로 자른다.
- (9) 깨끗한 슬라이드글라스 위에 시료포집면을 아래로 향하게 하여 필터를 덮고 아세톤 증기발생장치로 고정 및 투명화한다.
- (10) 트리아세탄을 2~3 방울 떨어뜨리고, 커버글라스를 덮어 현미경 관찰표본을 만든다.

6.2 분석방법

6.2.1 석면의 계수

- (1) 위상차현미경(접안렌즈 10배, 대물렌즈 40배)을 이용하여 관찰표본 중의 석면소체를 계수한다(별첨. 석면소체의 형태 예시 참조). 필터의 전체면을 관찰하여 석면소체의 수를 기록한다.
- (2) 시야를 상하좌우로 분석자가 관찰하고자 하는 방향으로 연속적으로 이동하여 계수한다. 접안렌즈에 장착된 현미경계수자의 크원을 기준으로 안쪽의 석면소체를 계수한다.
- (3) 그림과 같이 전면계수의 경우(실선) 시야상을 1/2 정도 겹치도록 하여 이웃한 시야로 이동한다. 시야수를 계수할 경우(점선) 시야상이 겹쳐지도록 하여 이웃한 시야로 이동하며 계수한다.



6.2.2 석면농도의 계산

(1) 다음 식에 의하여 시료분취율을 계산한다.

$$F = \frac{V_a}{V} \times \frac{A_c}{A_e}$$

- F : 분취율
- V_a : 전체 용액 중 분취량(ml)
- V : 전체 용액량(ml)
- A_c : 계수면적(mm²)
- A_e : 유효필터면적(mm²)

(2) 다음 식에 의하여 석면소체의 농도를 계산한다.

$$C_{AB} = \frac{N_{AB}}{F \times W_L}$$



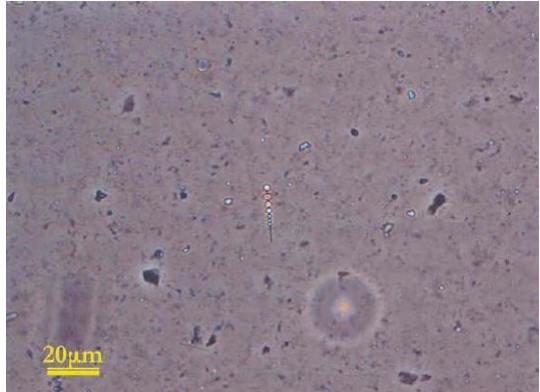
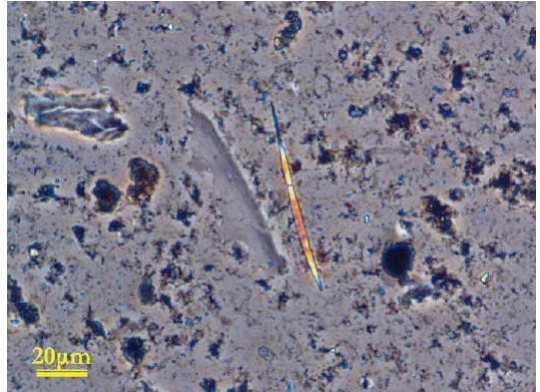
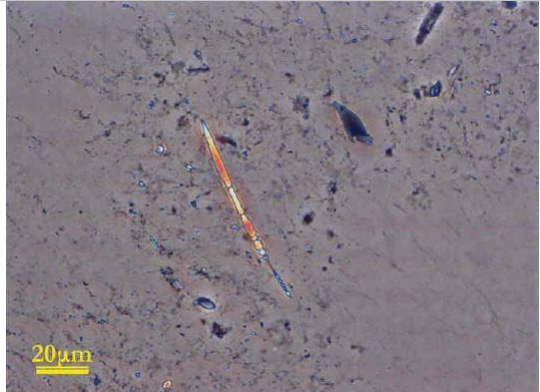
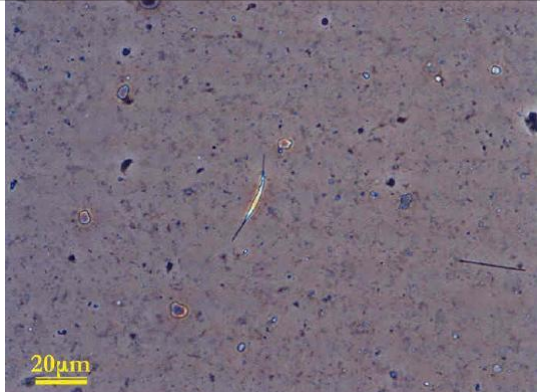
- C_{AB} : 석면소체의 농도(개/g 건조폐)
- N_{AB} : 시료에 수 계수한 석면소체의 숫자(개)
- F : 분취율
- W_L : 시료의 건조중량(g)

(3) 필터 전면을 계수하여 농도계산을 할 경우에는 필터 위에 포집된 시료면의 면적(유효필터면적)이 필요하다. 사용한 흡인여과기의 직경과 필터위에 포집된 시료면의 직경을 측정한 후 면적을 계산한다. 25 mm 여과지인 경우 385 mm²이다.

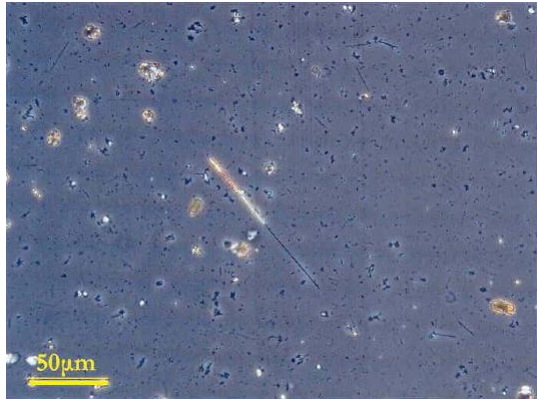
(4) 검출하한값을 계산한다. 검출하한값은 계수한 결과 1개의 석면소체가 검출되었을 경우의 농도로 계산한다.

(5) 필요에 따라 석면소체 계수와 동시에 석면섬유를 계수하는 것이 좋다. 섬유농도의 계산법은 석면소체의 경우와 같다.

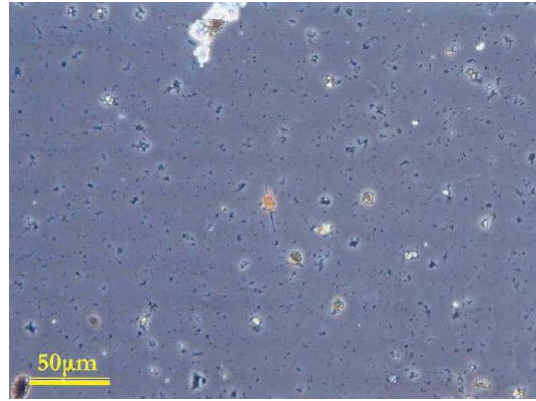
<별첨> 석면소체의 형태(예시)

1. 섬유 양쪽 끝이 둥근 분절로 쌓여 있는 아령모양의 석면소체	2. 섬유 양쪽 끝이 둥근 분절로 쌓여 있는 형태의 석면소체
	
3. 둥근 분절이 늘어서 있는 염주 또는 경단 모양의 석면소체	4. 섬유가 깊게 덮여있는 형태의 석면소체
	
5. 다수의 분절로 섬유가 길게 덮여 있는 형태의 석면소체	6. 섬유가 훌쭉하게 덮여있는 형태의 석면소체
	

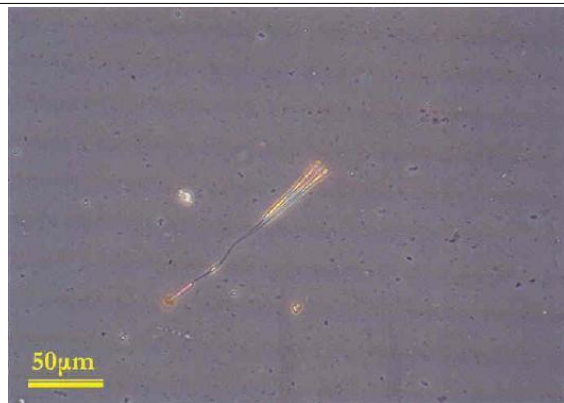
7. 다수의 분절로 섬유가 흩쭈하게
펼쳐있는 형태의 석면소체



8. 하나의 섬유에 몇 개의 분절을
수반하는 석면소체



9. 복수의 섬유가 있는 석면소체



10. 섬유가 굴곡되어 있는 석면소체

