

KOSHA GUIDE

T - 31 - 2021

## 시험동물 조직의 박절 및 염색 지침

2021. 12.

한국산업안전보건공단

## 안전보건기술지침의 개요

- 작성자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 최 혜 연
- 제·개정 경과
  - 2021년 11월 산업독성분야 제정위원회 심의
- 관련규격 및 자료
  - Drug safety evaluation, Histopathology Procedures: From Tissue Sampling to Histopathology Evaluation, 2011
  - Leica biosystems, H&E Staining Overview: A Guide to Best Practices, 2021
  - OECD, Guidance document on histopathology for inhalation toxicity studies, supporting TG 412 and TG 413. 2010
- 관련법규·규칙·고시 등
  - 산업안전보건법 제105조(유해인자의 유해성·위험성 평가 및 관리), 제108조(신규 화학물질의 유해성·위험성 조사)
  - 산업안전보건법 시행규칙 제141조(유해인자의 분류기준), 제143조(유해인자의 관리 등)
  - 고용노동부 예규 제166호(화학물질의 유해성·위험성 평가에 관한 규정)
  - 국립환경과학원 고시 제2020-46호(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 : 2021년 12월

제 정 자 : 한국산업안전보건공단 이사장

## 시험동물 조직의 박절 및 염색 지침(안)

### 1. 목 적

이 지침은 산업안전보건법 제105조(유해인자의 유해성·위험성평가 및 관리), 제108조(신규화학물질의 유해성·위험성 조사), 산업안전보건법 시행규칙 제141조(유해인자의 분류기준), 제143조(유해인자의 관리)에 따라, 화학물질 건강유해성시험법의 조직병리검사 절차 중 박절 및 염색 방법을 정함을 목적으로 한다.

### 2. 적용범위

이 지침은 법과 관련하여 화학물질 건강유해성시험법의 조직병리검사 항목 중 박절 및 염색 방법에 적용한다.

### 3. 용어의 정의

(1) 이 지침에서 사용되는 용어의 정의는 다음과 같다.

(가) “박절(Cutting)”이라 함은 조직 내부의 구조를 현미경으로 관찰할 수 있도록 일정한 두께로 얇게 자르는 과정을 말한다.

(나) “염색(Staining)”이라 함은 세포 등에 특수한 염료를 이용하여 색상을 입혀 현미경 관찰을 용이하도록 하는 과정을 말한다.

(다) “함수(Rehydration)”이라 함은 조직 내 손실된 수분을 보충하는 과정을 말한다.

(라) “분별(Differentiation)”이라 함은 비특이적 배경 염색을 제거하고 대비를 향상시키는 것을 말한다.

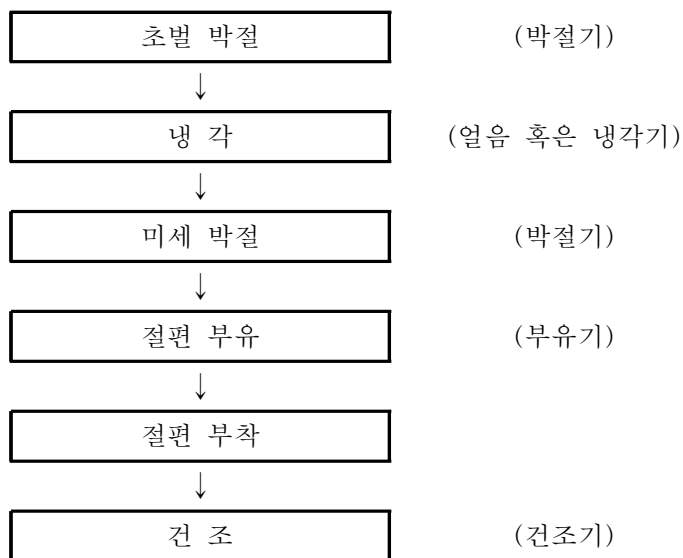
(마) “봉입(Mounting)”이라 함은 염색이 완료된 조직이 손상되지 않도록 특수한 시약으로 처리하는 과정을 말한다.

(바) “크실렌 대체제(Xylene substitute)”이라 함은 크실렌을 대체하여 사용할 수 있는 제품으로서, 이 용 시 병리조직학적 검사용 염색 시약으로 시판되는 제품(예: Histo-clear II, S3 Histo 등) 중 염색기에서 사용 가능한 제품으로 선택한다.

(2) 그 밖의 용어의 뜻은 이 지침에서 특별한 규정이 있는 경우를 제외하고는 산업안전보건법, 같은 법 시행령, 같은 법 시행규칙에서 정하는 바에 의한다.

## 4. 시험방법

### 4.1 박절 작업 절차



### 4.2 박절(부유기, 건조기, 냉각기, 박절기 사용)

(1) 부유기에 물을 채우고 35~50℃로 온도를 설정한다.

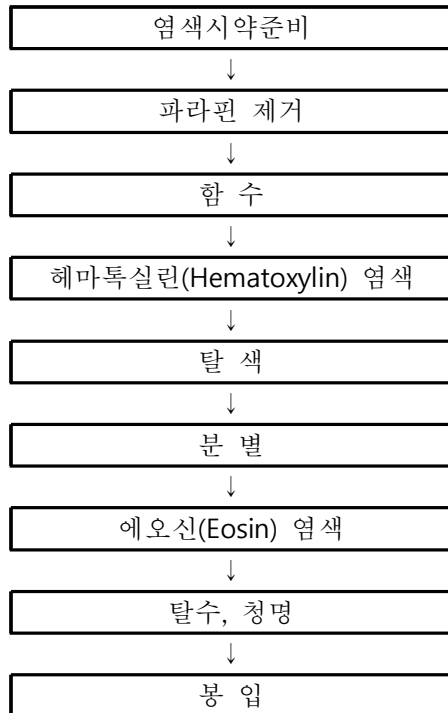
(2) 건조기의 온도를 40~60℃로 설정하고 냉각기 혹은 얼음을 준비한다.

- (3) 조직이 들어있는 카세트블록을 박절기에 끼운 후 적합한 조직 단면이 보일 때까지 초벌 박절한다.
- (4) 초벌 박절한 조직 단면을 얼음 혹은 냉각기로 냉각시킨다.
- (5) 냉각된 조직 단면을 2~5  $\mu\text{m}$ 의 두께로 미세 박절하고, 적절한 조직 형태가 형성되면 3~4개 정도의 조직 절편을 만든 후 가장 적절한 절편 한 개를 선택하여 모서리 부분을 잡고 부유기에 띄운다.
- (6) 부유기 위 조직 절편의 주름이 적당히 퍼지면 절편을 슬라이드 글라스에 얹는다.
- (7) 슬라이드 글라스를 수직에 가깝게 세워 건조기 위에서 건조시키고 조직 절편의 미세한 주름들이 완전히 퍼지면 실온에서 건조시킨다.

#### 4.3 박절 시 주의사항

- (1) 부유기 물 위에 먼지 등 이물질이 떠다니지 않도록 주의한다.
- (2) 박절기에 사용되는 칼날 등에 상처를 입지 않도록 주의하고 박절 작업 시 적절한 보호구(안전장갑 등)를 사용하도록 한다.

#### 4.4 염색 작업 절차



#### 4.5 염색(염색기 사용)

- (1) 염색기 사용 전 각 시약의 상태를 확인한 후 필요시 시약교체주기에 맞춰 시약을 교체한다. 시약의 교체주기는 아래의 <표 1> 및 사용하는 염색기의 설명서를 참고한다.

<표 1> 염색시약 교체주기

시약명	교체주기
크실렌1, 2	슬라이드 3000장 염색 후 시약교체 혹은 시약 개봉 후 일주일내 시약교체
크실렌 대체제*	
헤마톡실린(Hematoxylin)	
분별 시약(Bluing buffer)	
에오신(Eosin)	
95% 에탄올1, 2, 3	
100% 에탄올1	염색 직전 시약교체
100% 에탄올2, 3, 4, 5	
증류수	

\* 시판되는 크실렌 대체제 중 사용하는 염색기에서 이용 가능한 제품 선택

- (2) 건조가 완료된 슬라이드를 염색기 전용 랙에 꽂고, 기기에 장착한 후 염색을 실시한다. 염색 실시 방법(시약 종류 및 시간 등)은 아래의 <표 2> 및 사용하는 염색기의 설명서를 참고한다.

&lt;표 2&gt; 염색 실시 방법

단계	시약명	시간(분:초)
1	크실렌 1	05:00 - 05:30
2	크실렌 2	03:00 - 03:30
3	100% 에탄올1	02:00
4	95% 에탄올1	02:00
5	95% 에탄올2	02:00
6	증류수	01:00
7	헤마톡실린(Hematoxylin)	01:30
8	증류수	01:00
9	분별 시약(Bluing buffer)	01:00
10	증류수	01:00
11	95% 에탄올3	01:00
12	에오신(Eosin)	03:00
13	100% 에탄올2	01:05
14	100% 에탄올3	01:05
15	100% 에탄올4	01:05
16	100% 에탄올5	01:05
17	크실렌 대체제*	01:00
18	봉입제	-

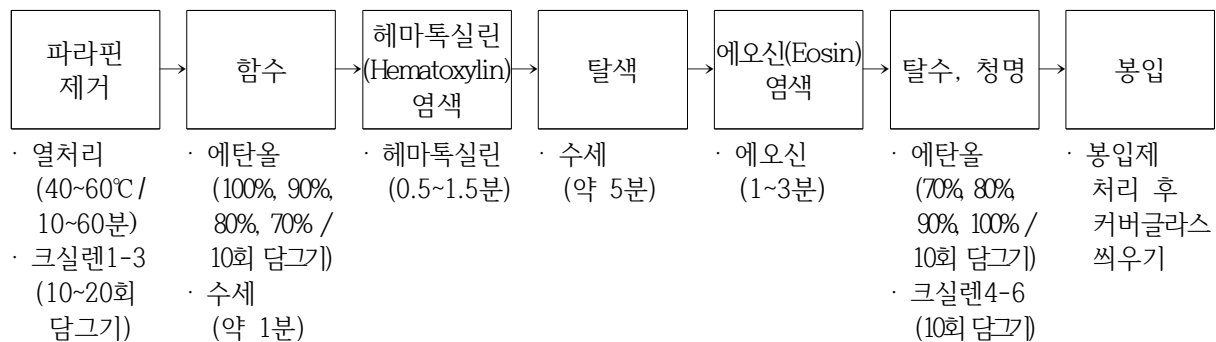
\* 시판되는 크실렌 대체제 중 사용하는 염색기에서 이용 가능한 제품 선택

- (3) 염색이 완료되면 랙에서 슬라이드를 빼내어 현미경의 저배율로 슬라이드의 품질을 확인하고 검경에 적합하지 않은 경우(검경에 적합한 단면이 아니거나 조직에 인위적인 불량이 있거나 불완전한 염색 등) 슬라이드를 다시 제작한다.
- (4) 품질 확인이 완료된 슬라이드는 적절한 보관함에 넣어 보관한다.
- (5) 사용 완료한 시약(크실렌, 헤마톡실린, 에오신, 크실렌 대체제 등)은 지정된 폐액통에 회수한 후 적합한 방법으로 폐기하도록 한다.

## 4.6 염색(수동)

- (1) 수동 염색 시 필요한 시약, 시약통 및 슬라이드 랙 등을 준비한다.
- (2) 아래의 <표 3>을 참고하여 수동 염색을 실시한다.

&lt;표 3&gt; 염색 실시 방법(수동)



- (3) 염색이 완료되면 랙에서 슬라이드를 빼내어 현미경의 저배율로 슬라이드의 품질을 확인하고 검경에 적합하지 않은 경우(검경에 적합한 단면이 아니거나 조직에 인위적인 불량이 있거나 불완전한 염색 등) 슬라이드를 다시 제작한다.
- (4) 품질 확인이 완료된 슬라이드는 적절한 보관함에 넣어 보관한다.
- (5) 사용 완료한 시약(크실렌, 헤마톡실린, 에오신 등)은 지정된 폐액통에 회수한 후 적합한 방법으로 폐기하도록 한다.

## 4.7 염색 시 주의사항

- (1) 에탄올, 크실렌 및 크실렌 대체제는 인화성 및 유독성 물질이므로 사용 시에는 전용 보호구(보안경, 방독마스크, 안전장갑 등) 또는 배기장치가 설치된 장소에서 사용하며, 전용 보관함에 보관한다.
- (2) 에탄올 및 크실렌, 크실렌 대체제 등이 눈이나 피부에 묻었을 경우에는 즉시 다량의 물 또는 생리식염수로 충분히 세정한다.