

KOSHA GUIDE

T - 32 - 2021

시험동물의 기관지·폐포 세척액 검사 지침

2021. 12.

한국산업안전보건공단

안전보건기술지침의 개요

- 작성자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 차 호 근
- 제·개정경과
 - 2021년 11월 산업독성분야 기준제정위원회 심의(제정)
- 관련규격 및 자료
 - OECD, Guidelines for The Testing of Chemicals, Test No. 412: Subacute Inhalation Toxicity: 28-Day Study, 2018
 - OECD, Guidelines for The Testing of Chemicals, Test No. 413: Subchronic Inhalation Toxicity: 90-Day Study, 2018
 - OECD, Guidance document on inhalation toxicity studies, Series on Testing and Assessment: No. 39, 2018
- 관련법규, 규칙, 고시 등
 - 산업안전보건법 제105조(유해인자의 유해성·위험성 평가 및 관리), 제108조(신규화학물질의 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
 - 시험동물의 기관지·폐포 세척액 검사 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 : 2021년 12월

제 정 자 : 한국산업안전보건공단 이사장

시험동물의 기관지·폐포 세척액 검사 지침

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 기관지·폐포 세척액 검사 방법을 정함을 목적으로 한다.

2. 적용범위

이 지침은 법과 관련하여 화학물질 건강유해성시험법의 기관지·폐포 세척액 검사 방법에 적용한다.

3. 용어의 정의

(1) 이 지침에서 사용되는 용어의 정의는 다음과 같다.

(가) “시험동물”이라 함은 시험에 사용되는 동물을 말한다.

(나) “검체 채취”라 함은 시험동물의 폐에서 기관지·폐포 세척액을 채취하는 과정을 말한다.

(다) “펠렛(Pellets)”이라 함은 침전물 또는 압착결정, 과립 등을 의미하며 시험과정 중 원심분리 후 상층액과 분리된 세포 침전물을 말한다.

(라) “현탁(Suspension)”이라 함은 묻혀있는 세포덩어리에 진동을 가하여 현탁시키는 과정을 말한다.

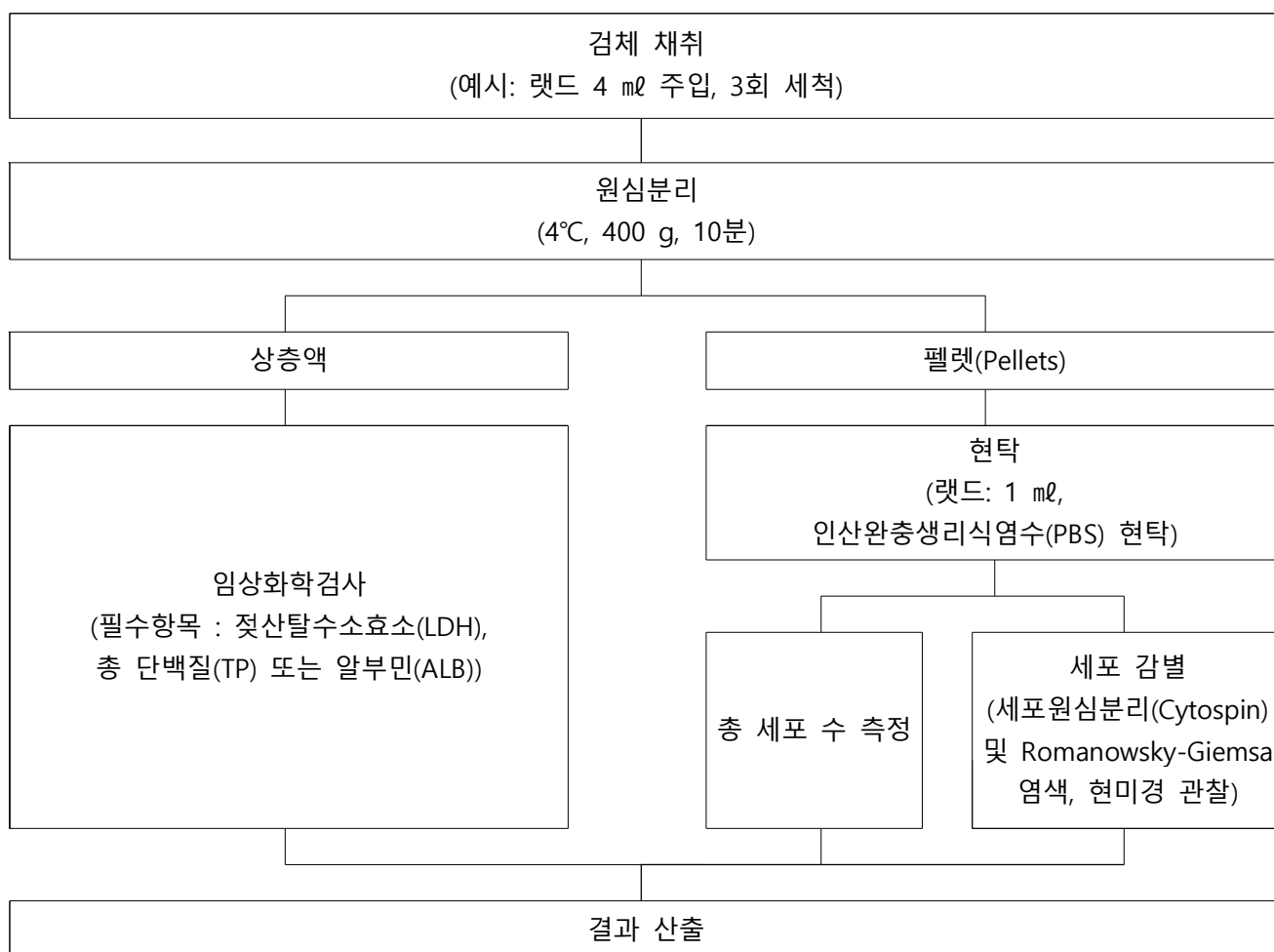
(마) “도말(Smear)”이라 함은 현탁된 펠렛을 한층으로 슬라이드에 부착시키는 작업을 말한다.

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

(2) 기타 이 지침에서 사용하는 용어의 정의는 특별한 규정이 있는 경우를 제외하고는 산업안전보건법, 동법시행령, 동법시행규칙 및 안전규칙에서 정하는 바에 의한다.

4. 검사 절차

4.1 작업 모식도



4.2 검체 채취 준비

- (1) “인산완충생리식염수(Phosphate Buffer Saline, PBS)”가 담긴 주사기에 주사바늘과 폴리에틸렌 튜빙을 연결하여 준비한다.
- (2) PBS의 용량은 폐엽이 완전히 퍼지는 용량을 주입하며, 동물 및 장기의 크기를 고려하여 적절한 주사바늘 및 튜빙의 크기를 선택한다.

<표 1> 시험동물 종별 검체 채취 준비사항 참고 수치

	랫드(Rat)	마우스(Mouse)
PBS 용량 계산	26 ~ 28 ml/ kg (체중)	
바늘크기	19 G	23 G
튜브내경	0.86 mm	0.58 mm

4.3 검체 채취

- (1) 조직병리검사를 위해 폐 좌엽(left lobe)을 제외하고, 우측 폐엽(Right cranial lobe, Right middle lobe, right caudal lobe, Accessory lobe)을 사용하여 검체를 채취한다.
- (2) 채혈과 안락사가 완료된 시험동물의 흉강을 열고, 좌측 폐엽에 PBS의 유입을 방지하기 위해 검자를 사용하여 왼쪽 기관지를 결찰시킨다.
- (3) 쇄골부분의 기관을 가위로 일정부분 절개하여 기관지에 튜빙을 흉선 부근까지 삽입하고 PBS의 역류를 방지하기 위해 기관과 튜빙을 실로 묶는다.
- (4) 주사기 안의 PBS를 우측 폐엽이 완전히 퍼질 때 까지 천천히 주입하고 회수하는 과정을 반복한다.

예시) 랫드의 우측 폐엽에 약 4 ml PBS를 주입하고 회수하는 과정을 3회 반복한다.

- (5) 최종 회수된 검체의 양은 최초 주입한 PBS의 양의 60% 이상이 되도록 한다.
- (6) 채취된 검체는 4℃ 이하로 냉장 보관한다.

4.4 원심분리 및 임상화학검사

- (1) 채취된 검체는 4℃에서 원심분리(400 g, 10분)하여 펠렛과 상층액을 분리시킨다.
- (2) 원심분리 후 피펫을 이용하여 상층액을 채취한다.
- (3) 상층액은 혈액생화학기기를 이용하여 젓산탈수소효소(LDH), 총 단백질(TP) 또는 알부민(ALB) 항목에 대해 필수적으로 임상화학검사를 실시한다. 단, 젓산탈수소효소(LDH)는 채취 당일 검사를 실시한다.
- (4) 필요에 따라 추가로 사이토카인(cytokine), 케모카인(chemokine) 등을 효소결합면역흡착검사(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 등으로 검사한다.

4.5 총 세포수 측정

- (1) 펠렛만 남은 검체에 4℃ 의 PBS를 첨가하여 침전된 세포를 현탁시킨다.
- (2) 현탁된 세포는 세포계수기를 이용하여 총 세포수를 측정한다.

4.6 기관지·폐포 세척액 검사 슬라이드 제작

- (1) PBS로 현탁시킨 검체를 세포원심분리기(Cytospin)를 이용(약 300 ~ 400 g, 10분)하여 슬라이드에 도말시킨다.
- (2) 세포원심분리기를 통해 제작된 슬라이드는 자연건조 시킨다.
- (3) 건조된 슬라이드는 Romanowsky-Giemsa 염색법에 따라 염색하고 염색 과정 중 슬라이드의 염색 상태를 확인하여 염색시간과 정도를 조절하며 염색한다.

예) 99.9% 메탄올 고정(약 5초, 5회) → Eosin 염색(약 5초, 5회) → Methylene Blue 염색(약 5초, 5회) → 증류수 행굼 → 슬라이드 건조

- (4) 염색된 슬라이드는 건조시키고 커버 슬라이드로 봉입한다.

4.7 세포감별

- (1) 봉입이 완료된 슬라이드는 광학현미경을 이용하여 대식세포, 림프구, 호중구, 호산구로 세포를 분류하고 총 세포수가 400개 이상이 될 때까지 세포를 감별한다.
- (2) 광학현미경으로 세포감별 시, 세포의 겹침이 적고 세포가 균등하게 도말된 부분을 시야의 중앙으로 위치시킨다.
- (3) 슬라이드를 ‘ㄴ’자 형태로 이동하며 세포감별을 실시한다.

4.8 주의사항

- (1) 채취된 세포는 사멸하지 않도록 분석하는 동안 4℃ 이하로 냉장 보관하고, 임상화학검사를 위해 분리한 상층액은 -20℃ 이하에서 보관한다.
- (2) 기관지·폐포 세척액 검사는 안전하고, 배기시설이 갖추어진 장소에서 실시한다.
- (3) 여러 마리를 동시에 검사할 때는 개체번호를 혼동하지 않도록 반복 확인한다.
- (4) 검체 채취 시 채취한 PBS 용량이 주입한 PBS 용량의 60% 이상이 회수되지 않았을 경우, 해당 동물번호, 채취 용량 및 사유를 기록한다.
- (5) 기기의 이상으로 분석을 실시하지 못할 경우, 해당 동물번호와 사유를 기록한다.
- (6) 세포감별 시, 슬라이드의 총 세포수가 400개 미만인 경우 해당 동물번호와 사유를 기록한다.
- (7) 슬라이드의 파손이 발생한 경우, 슬라이드 제작 당일에 파손이 발생한 경우에는 즉시 재제작하고, 슬라이드의 재제작이 불가능한 경우에는 해당 동물번호와 사유를 기록한다.

KOSHA GUIDE
T - 32 - 2021

5. 이상 발생시의 처치

- (1) 작업 시 주사바늘에 찔리지 않도록 주의하고 바늘에 찔렸을 경우, 즉시 작업을 중단하고 지혈 및 소독한다.
- (2) 상처가 깊은 경우 의사의 진단을 받는다.