

KOSHA GUIDE

T - 2 - 2023

## 화학물질의 아급성 독성시험 기술지침

2023. 8.

한국산업안전보건공단

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

## 안전보건기술지침의 개요

- 작성자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 김 현 영
- 개정자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 흡입독성연구센터 조은상
- 제·개정 경과
  - 2013년 6월 산업독성분야 제정위원회 심의
  - 2015년 5월 산업독성분야 제정위원회 심의(개정, 법규개정조항 반영)
  - 2016년 10월 산업독성분야 제정위원회 심의(개정, 법규개정조항 반영)
  - 2017년 9월 산업독성분야 제정위원회 심의
  - 2023년 7월 산업독성분야 표준제정위원회 심의(개정)
- 관련규격 및 자료
  - 국립환경과학원고시 제2023-19호(화학물질의 시험방법에 관한 규정)
  - 식품의약품안전처고시 제2022-18호(의약품 등의 독성시험기준)
  - OECD, OECD Guideline for the testing of chemicals. 2012
- 관련법규·규칙·고시 등
  - 산업안전보건법 제105조(유해인자의 유해성·위험성평가 및 관리)
  - 산업안전보건법 시행규칙 제142조(유해성·위험성 평가대상 선정기준 및 평가방법 등)
  - 고용노동부예규 제203호(화학물질의 유해성·위험성 평가에 관한 규정)
- 안전보건기술지침의 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 관련규격 및 자료, 법규 등에 관하여 최근 개정본이 있을 경우에는 해당 개정본의 내용을 참고하시기 바랍니다.

공표일자 : 2023년 8월 24일

제 정 자 : 한국산업안전보건공단 이사장

## 목 차

1. 목적 .....	1
2. 적용범위 .....	1
3. 용어의 정의 .....	1
4. 시험의 준비 .....	2
4.1 실험동물 .....	2
5. 시험방법 .....	3
5.1 원리 .....	3
5.2 시험물질 .....	3
5.3 관찰 및 측정사항 .....	4
6. 시험결과 및 보고 .....	6
6.1 결과의 처리 .....	6
6.2 시험 결과의 보고 .....	7

# 화학물질의 아급성 독성시험 기술지침

## 1. 목적

이 지침은 산업안전보건법 및 고용노동부예규 등에 의거 독성 미확인 화학물질에 대해 시험동물을 이용하여 28일 동안 반복 투여시 나타나는 생체의 영향을 확인하기 위해 시험방법을 제정하여 시험 결과의 신뢰성을 확보하는데 그 목적이 있다.

## 2. 적용범위

이 지침은 산업안전보건법 및 고용노동부예규 등에 의거 시험동물을 이용한 아급성독성시험(28일 반복 독성시험) 방법 및 결과보고서의 작성에 적용한다.

## 3. 용어의 정의

(1) 이 지침에서 사용하는 용어의 뜻은 다음과 같다.

(가) “아급성독성”이란 랫드(Rat) 또는 마우스(Mouse)에 경구, 흡입 등의 투여 경로를 통해 시험물질을 28일 동안 반복 투여하였을 때 시험동물에 나타나는 영향을 말한다.

(나) “우수실험실 운영규정(Good Laboratory Practice, GLP)”이란 독성 시험기관에서 행해지는 시험계획, 실행, 점검, 기록, 보고 등 시험과정과 방법의 총체적 사항을 규정한 것을 말한다.

(다) “용량-반응(Dose-response) 관계”란 화학물질의 노출량과 생체에 작용하는 영향과의 양-반응 관계를 말한다.

(라) “최대무독성용량(No observed adverse effect level, NOAEL)”이란 시험물질이 투여되었을 때 악영향을 나타내지 않는 최대용량을 말한다.

(마) “신뢰정보증업무(Quality assurance unit, QAU)”란 시험성적의 신뢰성을 확인하기 위해 운영책임자가 지명하는 자에 의하여 이루어지는 해당 시험 및 시설에 대한 신뢰정보증 관련 업무를 말한다.

(바) “검체(Sample)”란 검사나 분석 또는 보관을 위해 시험동물로부터 얻어진 것을 말한다.

(사) “회복군(Satellite group)”이란 본시험에서 시험물질 투여 완료 후 시험물질에 의한 독성변화의 지연성과 회복성을 검토하기 위해 구성하는 시험군을 말한다.

(2) 그 밖에 이 지침에서 사용하는 용어의 정의는 특별한 규정이 있는 경우를 제외하고는 산업안전보건법, 같은 법 시행령, 같은 법 시행규칙 및 산업안전보건기준에 관한 규칙에서 정하는 바에 따른다.

## 4. 시험의 준비

### 4.1 실험동물

#### (1) 동물의 종 및 성

원칙적으로 랫드의 암컷 및 수컷을 사용한다.

#### (2) 연령

가능한 5 또는 6 주령으로 하고, 체중이 고른 동물을 사용한다. 체중의 변동은 평균체중의  $\pm 20\%$  이내로 한다.

단, 5 또는 6 주령의 동물을 사용 않을 경우에는 이유를 설명해야하며, 가능한 8주령을 넘지 않는 것이 좋다.

#### (3) 동물 수

각 군은 암, 수 각 5 마리 이상으로 한다. 또 중간에 부검하여 검사를 하는 경우는 필요한 수를 미리 추가한다. 회복시험을 하는 군(회복군)을 설정할 수 있으며, 회복군의 동물 수는 1군당 암·수 각 5 마리 이상으로 한다. 회복시험을

실시하는 경우 시험물질의 투여를 종료한 후 2 주간 행하며, 회복군의 용량은 고용량군의 용량으로 한다. 흡입시험의 경우 난용성 물질의 시험을 위해 폐 침착(Lung burden) 시험 및 기관지폐포세척액(Bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 분석을 할 수 있도록 별도의 군을 1개 또는 2개 둘 수 있다.

#### (4) 사육조건

(가) 시험동물은 용량군 및 성별 등으로 나눠 케이지에 사육하고, 흡입노출의 경우 관찰을 용이하게 하기 위하여 개별적으로 사육할 수 있다.

(나) 실험동물을 사육하는 공간의 온도는  $22\pm3^{\circ}\text{C}$ 가 되도록 한다.

(다) 상대습도는  $50\pm20\%$ 를 유지하는 것이 이상적이다.

(라) 동물이 두부 노출형 챔버에 노출될 때, 홀더로 인하여 스트레스를 받을 수 있으므로, 시험 전 적응훈련을 할 필요가 있다.

(마) 음용수는 무제한으로 공급하여야 하며, 사료는 흡입 노출되는 동안을 제외하고 일반적으로 사용되는 것을 공급한다.

(바) 조명은 12시간 간격으로(가능한 08:00~20:00 점등) 조절한다.

## 5. 시험방법

### 5.1 원리

몇 가지 용량의 시험물질을 28일 동안 투여하며 독성징후를 매일 관찰하고 시험기간 중 사망 동물 및 끝까지 살아남은 동물을 부검하여 병리조직학적, 임상적 검사를 실시한다. 또한 시험계획단계에서 종료의 전체 과정은 우수 실험실 운영규정에 준해서 실시되어야 하며, 이의 준수 여부를 신뢰성 보증 업무를 통해 확인한다.

### 5.2 시험물질

#### (1) 투여방법

시험물질의 성상 및 사용환경 등을 고려하여 경구투여(위관, 사료 또는 음용수 혼합), 흡입노출 등으로 한다.

## (2) 용량

투여량은 시험물질과 독성징후의 용량-반응 관계를 통하여 3 단계 이상을 설정한다. 고용량은 독성영향이 나타나는 용량으로 선택해야 하지만 동물을 죽음에 이르게 하거나, 독성평가에 장애가 되는 용량을 선택해서는 안된다. 저용량은 용량-반응 및 최대무독성용량이 예측되는 용량으로 설정한다. 또 고용량과 저용량 간에 1단계 이상의 중간용량을 두고 별도로 대조군을 둔다. 실제 시험물질 취급량은 투여 경로에 따라 동물의 사료섭취량(Food consumption) 또는 음수섭취량(Water consumption)과 시험물질의 농도로부터 산출한다. 또한, 위관투여의 경우는 체중 kg당 1 g의 용량으로 하고 사료 또는 음용수에 첨가하여 투여하는 경우는 사료 또는 음용수로부터 섭취되는 시험물질의 양이 체중 kg당 1 g에 상당하는 용량으로 한다. 단, 랫드의 경우 체중 1 kg당 1 g의 용량에 상당하는 사료 또는 음용수 중의 농도는 투여기간 등에 따라 변하는 경우도 있으나 어떤 경우에도 5%를 기준으로 한다.

## (3) 투여기간

28일간 투여한다.

# 5.3 관찰 및 측정사항

## (1) 일반상태 관찰

매일 적어도 1회 동물의 일반증상을 세밀히 관찰한다. 동물의 생존 유·무, 임상상태, 그리고 군마다 동물수를 항상 확인하여 시험동물의 누락이 없도록 한다. 또한 필요에 따라 기구, 기계 등을 사용한다.

(가) 피모(Skin and fur), 안구, 점막, 호흡기계, 순환기계, 자율신경계, 중추신경계, 운동 및 행동 패턴 등에 대하여 상태의 발현시간, 정도, 지속시간을 본다.

(나) 필요에 따라 기구, 기계 등을 사용한다.

## (2) 체중, 사료 및 음수섭취량

체중, 사료섭취량 및 음수섭취량(시험물질을 음용수에 첨가한 경우)을 주 1회 이상 측정한다.

## (3) 혈액검사

## (가) 혈액학적 검사

적혈구 수, 적혈구 용적, 혈색소농도, 헤모글로빈, 백혈구 수 및 백혈구백분율, 혈소판 수, 그 밖에 혈액응고 등의 지표로서 혈액응고시간 등이 있으며, 또한 화학구조 등으로 보아 독성영향이 예측되는 항목, 예를 들면 망상적혈구수 등에 대해서도 검사한다.

## (나) 혈액생화학적 검사

아스파라긴산 아미노전이효소, 알라닌 아미노전이효소, 알칼리성 인산분해효소, 감마 글루타밀 전이효소, 크레아틴 인산효소, 총 빌리루빈 등과 혈당, 총콜레스테롤, 요소, 크레아티닌, 총단백질 및 알부민, 그 밖에 화학구조 등으로 보아 독성영향이 시작되는 항목, 예를 들면 젖산 탈수소 효소(Lactate dehydrogenase, LDH), 콜린에스테라제(Cholinesterase), 호르몬(Hormone), 산/염기평형, 메트헤모글로빈(Methemoglobin), 오르니틴 카르복실(Ornithine carboxylase) 등에 대해서도 검사한다.

## (4) 뇨 검사

뇨의 외관, pH, 잠혈, 단백질, 당, 케톤(Ketone)체의 검사, 필요에 따라서 요량 측정 및 침사의 현미경을 이용한 검사를 실시하며, 투여기간 중 1회 이상 한다.

## (5) 병리학적 검사

## (가) 육안적 검사 및 기관중량

시험에 사용된 모든 동물은 체표, 개구부, 두개, 흉강, 복강과 그 내용의 관찰을 포함한 육안적 검사를 충분히 한다. 조직병리학적 검사를 위해서 다음의 기관·조직을 적당한 보존액 중에 보존한다.



[모든 육안적 병소, 뇌\*, 뇌하수체, 척수, 눈, 위, 소장, 대장, 간장\*, 신장\*, 부신\*, 비장\*, 심장\*, 가슴샘\*, 갑상샘, 기관, 폐, 고환\*, 난소\*, 자궁 및 자궁경부\*, 부고환\*, 전립샘, 정낭샘, 응고샘, 질, 방광, 림프절, 말초신경, 골격근, 뼈, 골수, 후두\*\*, 비인두조직\*\*, 후두망울\*\*, 폐문부림프절\*\*]

\* 표시를 한 모든 기관은 그 중량을 측정한다. 흡입시험의 경우 폐는 BALF 채취 부위를 제외하고 중량을 측정한다.

\*\* 표시를 한 기관은 흡입시험의 경우 추가로 보존한다.

(나) 조직학적 검사(필요에 따라 전자현미경을 이용)를 한다. 병리조직학적 검사는 고용량군과 대조군에서 채취하여 보존한 기관·조직에 대해 실시하고, 육안소견, 장기중량 측정 결과에서 표적기관이라고 인정된 기관·조직 및 기타의 관찰·검사의 결과나 화학구조 등에 의하여 독성영향이 나타나는 것으로 확인된 기관·조직에 대해서도 검사한다.

(다) 고용량군에서 변화가 인정된 기관이나 조직에 대해서도 다른 용량군 및 회복군에 대해서도 실시한다. 고용량군의 병리조직학적 관찰에서 어떤 변화가 관찰되어 더욱 면밀한 검사가 필요한 경우에는 기타 용량군에 대해서도 관찰하도록 한다. 회복군에 대한 관찰은 조직학적 변화가 관찰된 기관이나 조직에 대해서는 특히 주의하여 조직학적 관찰을 하여야 한다.

#### (6) 그 밖의 필요한 사항

(가) 시험 중 사망한 동물에 대해서는 가능한 한 그 사인을 조사한다. 상태가 극히 불량하게 되어 죽음이 임박한 동물은 신속하게 희생하여 부검한다.

(나) 투여 경로 및 물질의 성상에 따라 기관지폐포세척 검사 및 폐침착 시험을 실시할 수 있다.

## 6. 시험결과 및 보고

### 6.1 결과의 처리

시험 결과는 우수실험실 운영규정에 따라 작성하고 최종보고서를 첨부한다. 또한, 가능한 항목에 대해서는 적당한 통계적 수법을 이용하여 처리한다.

## 6.2 시험 결과의 보고

시험보고서는 경구 시험을 기준으로 다음의 항목을 포함한다.

- (1) 시험기관의 명칭 및 소재지
- (2) 시험책임자 및 담당자 성명
- (3) 시험물질 정보(식별정보, CAS 등록 번호, 물리적 성상, 순도, 이화학적 성질, 안정성, 용매에서의 용해도 및 안정성) 및 용매 등의 종류 및 선정 근거
- (4) 시험동물의 정보(종/계통, 수량, 주령, 성별, 공급원, 식별방법, 체중범위 등), 사료 및 환경 조건
- (5) 시험 조건(용량 선정의 근거, 시험물질 제형 및 농도, 안정성/동질성, 투여에 대한 사항, 실제 투여량 환산계수 등)
- (6) 시험 결과(체중 변화, 사료 및 음수섭취량, 성별 및 용량별 독성 반응 자료, 시험중/종료 시 동물의 생존 사항, 임상 증상, 혈액학적 검사 결과, 혈액생화학적 검사 결과, 뇨검사 결과, 기관 중량 측정 결과, 부검 육안 소견, 병리조직학적 결과, 통계 처리 결과)
- (7) 결론
- (8) 신뢰성보증업무에 의한 신뢰성보증 확인서

## 안전보건기술지침 개정 이력

□ 개정일 : 2023. 8. 24.

- 개정자 : 안전보건공단 산업안전보건연구원 흡입독성연구센터 조은상
- 개정사유 : 산업안전보건법 화학물질 유해성 평가 관련 법 조항 변경 및 최신화 등
  - 제39조(유해인자의 관리 등) → 제105조(유해인자의 유해성·위험성평가 및 관리)
  - 시행규칙 제142조(유해성·위험성 평가대상 선정기준 및 평가방법 등) 추가
  - 고용노동부 예규 제203호 추가
  - 국립환경과학원고시 제2023-19호(화학물질의 시험방법에 관한 규정) 최신화
  - 식품의약품안전처고시 제2022-18호(의약품등의 독성시험기준) 최신화
- 주요 개정내용
  - 투여 경로에 따른 단어 정의, 검사 항목 등의 변경 및 최신화 및 일부 사항 삭제 등