

KOSHA GUIDE

T - 27 - 2022

실험동물 조직의 삭정을 위한 기술지침

2022. 12.

한국산업안전보건공단

안전보건기술지침의 개요

- 작성자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 조 은 상
- 개정자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 조 은 상
- 개정자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 이 미 주

- 제·개정 경과
 - 2017년 9월 산업독성분야 기준제정위원회 심의(제정)
 - 2018년 9월 산업독성분야 기준제정위원회 심의(개정)
 - 2022년 12월 산업독성분야 표준제정위원회 심의(개정)

- 관련규격 및 자료
 - RITA and NACAD groups : Revised Guides for Organ Sampling and Trimming in Rats and Mice - Part 1, 2, 3
 - 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)
 - 산업안전보건법 시행규칙 제142조(유해성·위험성 평가대상 선정기준 및 평가방법 등)
 - 고용노동부 예규 제166호(화학물질의 유해성·위험성 평가에 관한 규정)

- 기술지침의 적용 및 문의
 - 이 기술지침에 대한 의견 또는 문의는 한국산업안전보건공단 홈페이지 (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 : 2022년 12월 31일

제 정 자 : 한국산업안전보건공단 이사장

실험동물 조직의 삭정을 위한 기술지침

1. 목 적

이 지침은 산업안전보건법 및 고용노동부 예규에 따라 화학물질 취급 및 노출에 의한 독성 및 건강장애에 관한 정보를 제공하기 위해 실시하는 화학물질에 의한 건강영향 평가시험 중 병리조직학적 검사에서 조직의 삭정방법에 대한 지침을 정하고자 한다.

2. 적용범위

이 지침은 산업안전보건법 및 고용노동부 예규에 의거 화학물질의 노출에 의한 유해성 확인을 위한 독성평가 기법 중 랫드 및 마우스의 병리조직학적 검사에 적용한다.

3. 용어의 정의

(1) 이 지침에서 사용되는 용어의 정의는 다음과 같다.

(가) “부검(Necropsy)”이란 사인을 밝히는 목적으로 동물 사체의 내·외부를 조사하는 것으로 장기 등을 채취해 검사하게 된다.

(나) “고정(Fixation)”이란 채취된 장기의 사후 변화나 부패를 방지하기 위해 고정액에 침지해 장기 내 미세구조의 변형을 방지하는 것이다.

(다) “삭정(Trimming)”이란 고정액에 고정된 실험동물의 생체 조직을 일정한 크기 및 방향으로 자르는 것을 말한다.

(라) “포르말린 용액”이란 조직의 고정을 위해 일반적으로 사용되는 10% 중성완충포르말린 (10% neutral buffered formalin)을 말한다.

(마) “시험계획서”란 해당 시험에 대한 시험 목적, 시험 방법, 범위 및 실험 계획을 규정하는 문서를 말한다.

(바) “표준작업지침서(Standard operating procedure, SOP)”란 시험계획서나 시험지침 등에 일반적으로 상세히 명시되지 않은 시험 및 활동 방법의 절차를 기술한 문서를 말한다.

(사) “카세트(Cassette)”란 조직 삭정 이후의 처리과정에서 용매가 용이하게 드나들 수 있도록 작은 타공이 되어있는 플라스틱 제품으로, 내열 및 내화학성을 지닌다.

(아) “탈회(Decalcification)”란 뼈 등의 칼슘 이온 성분을 제거하여 삭정 및 이후의 과정이 원활하게 진행되도록 조직을 탈회 용액에 처리하는 과정이다.

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

4. 조직 삭정의 절차와 방법

4.1 일반적인 주의 사항

- (1) 삭정하는 동안 조직이 건조되지 않도록 카세트가 고정액이나 물에 약간 잠긴 상태를 유지한다.
- (2) 삭정용 칼은 예리한 것을 사용하여 자를 때 조직에 압력이 가해지지 않도록 한다.
- (3) 보호구(보호안경, 수술용 고무장갑, 방독마스크 등)를 반드시 착용한다.
- (4) 유해한 고정액(포르말린 용액 등)의 흡입을 방지하기 위해 국소배기 장치가 설치된 곳에서 작업을 한다.

4.2 부검 소견의 확인

- (1) 삭정을 실시하기 전 부검시 작성된 기록지의 내용을 확인하고, 소견이 있을 경우 고정된 장기와 대조하여 확인한다.
- (2) 삭정 장기의 종류와 정해진 삭정 부위 외 수정 또는 추가된 소견은 시험계획서의 지시대로 실시한다.

4.3 실시 순서

- (1) 삭정을 실시하기 전 작업자는 시험계획서에서 요구하는 조직 제작 장기 목록을 확인한다.
- (2) 부검시 촬영된 소견 사진이 있다면 함께 확인한다.
- (3) 고정병의 시험번호 및 동물번호가 카세트에 기재된 시험번호, 동물번호와 일치하는지 확인하고 삭정한 장기가 바뀌지 않도록 주의한다.
- (4) 고정병에서 장기들을 꺼내 물에 행귀 고정액을 씻어낸다.
- (5) 탈회가 필요한 조직(대퇴골, 비강 등)은 탈회 용액에 침지해 조직 내 칼슘을 제거한다.
- (6) 수세된 장기들을 삭정방법표<별표 1> 및 <별표 2>에 따라 삭정하여 카세트에 넣는다.
- (7) 삭정방법표<별표 1> 및 <별표 2>에 정해진 삭정부위 외에 다른 부위에 병변이 있는 경우 지정된 삭정 부위와 병변 부위를 각각 삭정한다.
- (8) 분실이 우려되는 작은 장기는 작은 크기의 카세트나 망사주머니를 이용한다.
- (9) 삭정된 장기가 들어있는 카세트를 2차 고정을 위해 새로운 고정병에 넣는다.
- (10) 삭정이 완료되면 기록지의 삭정란에 삭정일을 기록하고 서명한다.

4.4 조직 삭정 방법

4.4.1 일반장기의 조직 제작

삭정은 시험계획서에서 특별히 지정되지 않는 한 삭정방법표<별표 1> 및 <별표 2>의 방법에 따라 삭정하는 것을 원칙으로 하되, 시험의 목적에 따라 삭정 방법을 변경할 수 있다.

4.4.2 이상소건의 조직 제작

육안적 이상이 관찰된 조직을 제작할 경우 아래의 원칙에 따라 실시한다.

- (1) 양측성 장기 중 한쪽만 제작하도록 계획한 시험에서 양측성 장기의 한쪽에서만 이상 소견이 관찰된 경우에도 양쪽 모두 제작할 수 있다.
- (2) 삭정방법표<별표 1> 및 <별표 2>에 지정된 삭정 부위에 이상 소견이 관찰되었을 때는 이상 소견이 포함되도록 삭정한다.
- (3) 삭정방법표<별표 1> 및 <별표 2>에 지정된 삭정 부위가 아닌 부위에서 이상 소견이 관찰되었을 때는 지정된 삭정 부위와 이상 소견이 관찰된 부위 모두를 삭정한다.
- (4) 이상 소견부위의 크기가 크고 형태가 다양한 경우에는 여러 부위를 삭정한다.
- (5) 육안적 이상 부위를 삭정할 때는 정상조직과의 연속성을 확인하기 위해 가능한 정상부위와 이상부위가 모두 포함되도록 한다.
- (6) 적출된 모든 조직을 제작하지 않고 이상소견이 관찰된 조직만 제작하는 경우에 난소, 자궁 등과 같이 이상 장기와 기능적 및 해부학적으로 밀접하여 이상 장기와 관련된 변화가 의심될 경우에는 이상소견이 없더라도 시험책임자 또는 병리책임자의 판단에 따라 관련 장기를 함께 삭정할 수 있다.

5. 조직의 보관 및 폐기

5.1 삭제 후 남은 장기의 보관

- (1) 삭제하고 남은 장기는 고정병에 넣어 밀봉한 후 시험번호, 동물번호, 부검일 등을 기재한다.
- (2) 밀봉한 후 고정액이 새는 곳이 없는지, 고정액이 부족하지 않은지 등을 살피고 빠진 동물이 없는지 확인한다.
- (3) 고정병은 환기 시설이 있는 저장소에서 보관한다.

5.2 삭제된 장기가 들어있는 카세트의 보관

삭제 장기가 들어있는 카세트는 시험번호를 부착한 고정병에 넣어 이후의 처리까지 환기 시설이 있는 저장소에서 보관한다.

6. 이상 발생시의 처리

6.1 삭제시 안전 위생

- (1) 포르말린 고정액이 눈이나 피부에 묻었을 경우에는 속히 다량의 식염수나 물로 충분히 씻어낸다.
- (2) 포르말린 가스를 흡입하여 비점막에 통증이 있는 경우에는 코세척을 수회 반복하고, 맑은 공기가 잘 통하는 곳에서 휴식을 취한다. 증상이 심하면 병원을 방문하여 의사의 진찰을 받는다.
- (3) 삭제칼에 의해 상처를 입었을 경우에는 지혈한다. 상처 부위가 큰 경우 즉시 의사에게 보이고 적절한 처치를 받는다.
- (4) 삭제 작업 전후 스트레칭 등을 실시하여 근골격계 부담을 줄이고 삭제 작업 중 손가락, 어깨 등에서 통증이 느껴질 때는 적절한 휴식을 취하여 만성적 질환으로 이어지지 않도록 한다.

6.2 삭제한 장기의 분실 또는 혼합

- (1) 삭제한 조직을 분실한 경우, 남아있는 장기를 다시 삭제한다. 남아있는 장기가 없는 경우 기록지에 분실장기명과 사유를 기록한다.
- (2) 삭제한 조직이 개체 간에 혼합되었을 경우에는 원래의 조직을 재삭정한다. 재삭정이 불가능한 경우, 기록지에 장기명과 사유를 기록한다.
- (3) 삭제시 고정 장기가 빠져있으면, 부검시 기록지를 확인하여 부검시 적출이 안된건지, 고정 과정 중 분실된 것인지 확인하고 기록지에 장기명과 사유를 기록한다.
- (4) 삭제 도중 장기를 분실한 경우 기록지에 장기명과 사유를 기록한다.
- (5) 위의 내용을 포함하여 시험의 결과에 영향을 미칠 수 있는 어떠한 이상이 발생한 경우 시험책임자에게 보고하고 기록한다.

7. 지침에서 정하지 않은 항목에 대한 사항

본 지침에서 정하지 않은 사항은 기관별 표준작업지침서 또는 시험계획서 등에서 권고하는 방법에 따라 실시한다.

<별표 1> 삭정방법표: 일반투여경로(경구, 정맥, 피하 등)

장기	삭정 방법
뇌 (Brain)	<ul style="list-style-type: none"> - 대뇌(cerebrum)의 시각교차(optic chiasm)부위에서 1개 삭정한다. - 대뇌의 시상하부 뒤쪽(posterior hypothalamus) 부위에서 1개 삭정한다. - 소뇌(cerebellum)의 중간부위에서 숨뇌(medulla oblongata)를 포함하여 1개 삭정한다.
척수 (Spinal cords)	<ul style="list-style-type: none"> - 목뼈(cervical vertebra), 등뼈(thoracic vertebra), 허리뼈(lumbar vertebra)의 척수를 가로축으로 삭정한다.
폐 (Lung)	<ul style="list-style-type: none"> - 좌측엽(left lobe)을 길이방향의 수평으로 삭정한다. - 선택적으로 우측꼬리엽(right caudal lobe) 및 우측머리엽(right cranial lobe)을 추가로 삭정할 수 있으며 이 때 우측꼬리엽은 길이방향의 수평으로, 우측머리엽(right cranial lobe)은 가로축으로 삭정한다.
인두 (Pharynx) 후두 (Larynx)	<ul style="list-style-type: none"> - 배쪽주머니(ventral pouch)가 나오도록 가로축으로 삭정한다.
기관 (Trachea) 식도 (Esophagus)	<ul style="list-style-type: none"> - 갑상샘을 분리 했을 때 : 갑상샘이 붙어 있던 위치에서 가로축으로 삭정한다. - 갑상샘을 분리하지 않았을 때: 갑상샘을 포함하여 가로축으로 삭정한다.
갑상샘 (Thyroid gland) 부갑상샘 (Parathyroid gland)	<ul style="list-style-type: none"> - 기관에 갑상샘이 붙어 있으면 기관, 식도와 함께 가로축으로 삭정한다. - 기관에서 분리된 갑상샘은 양쪽 모두 세로축으로 이용한다.

간 (Liver)	<ul style="list-style-type: none"> - 좌측가쪽엽(left lateral lobe)의 중간부에서 가로축으로 1개 설정한다. - 랫드는 우측 중간엽(right medial lobe)의 중앙에서 가로축으로 1개, 마우스는 좌측 및 우측 중간엽 사이에 있는 담낭이 포함되도록 좌우 중간엽을 세로축으로 1개 설정한다.
콩팥 (Kidney)	<ul style="list-style-type: none"> - 왼쪽 콩팥의 중심부를 가로축으로 설정한다. - 오른쪽 콩팥의 중심부를 세로축으로 설정한다. - 양쪽 콩팥 모두 겉질(cortex), 속질(medulla), 콩팥갈때기(renal pelvis), 콩팥유두(papilla)가 포함되어야 한다.
위 (Stomach)	<ul style="list-style-type: none"> - 들문부(cardial region)에서 날문부조임근(pylosic sphincter)을 거쳐 샘창자(duodenum)까지 길게 1개 설정한다. - 앞위(forestomach)와 샘위(glandular stomach)의 경계부(limiting ridge)를 포함하도록 1개 설정한다.
샘창자 (Duodenum)	<ul style="list-style-type: none"> - 날문부조임근(pylosic sphincter)에서 1.0cm 이후 지점에서 가로축으로 설정한다.
빈창자 (Jejunum) 돌창자 (Ileum) 막창자 (Cecum) 잘룩창자 (Colon) 곧창자 (Rectum)	<ul style="list-style-type: none"> - 빈창자 : 빈창자의 중심부에서 Peyer's patch가 포함되도록 가로축으로 설정한다. 빈창자에서 Peyer's Patch의 관찰이 어려울 경우 다른 소화기관에 포함되어도 상관없다. - 돌창자 : 막창자로부터 1~1.5cm 몸쪽을 가로축으로 설정한다. - 막창자 : 막창자의 중심부를 가로축으로 설정한다. - 잘룩창자 : 잘룩창자의 중심부를 가로축으로 설정한다. - 곧창자 : 항문에서 2cm 몸쪽을 가로축으로 설정한다.
고환 (Testis)	<ul style="list-style-type: none"> - 양쪽 모두 고환그물(rete testis)이 포함되도록 가로축으로 설정한다.

부고환 (Epididymis)	- 양쪽 모두 머리(head), 몸통(body), 꼬리가 모두 포함되게 세로축으로 삭정 한다.
방광 (Urinary bladder)	- 방광정점(vertex), 배쪽몸통 (ventral body), 삼각부(trigone), 목(neck)이 모두 포함되도록 등쪽-배쪽면을 세로축으로 삭정 한다.
전립샘 (Prostate)	- 등쪽가쪽엽(dorsolateral and ventral lobe) 및 배쪽엽(ventral lobe)이 한 면에 나타나도록 세로축으로 삭정 한다.
정낭 (Seminal vesicle) 응고샘 (Coagulation glands)	- 정낭은 왼쪽, 오른쪽 모두 응고샘이 포함되도록 중간부에서 가로축으로 삭정 한다.
음경꺼풀샘 (Preputial gland)	- 전체를 수평으로 삭정 한다.
음핵샘 (Clitoral gland)	- 전체를 수평으로 삭정 한다.
자궁 (Uterus) 질 (Vagina)	- 자궁뿔(uterine horn)의 중간부를 가로축으로 삭정 한다. - 자궁몸통(body)와 자궁목(cervix)의 전 부분을 세로축으로 삭정 한다. - 질의 전 부분을 세로축으로 삭정 한다.
침샘 (Salivary gland)	- 혀밑샘(sublingual gland), 턱밑샘(mandibular gland) 및 귀밑샘(parotid gland)이 모두 포함되도록 세로축으로 삭정 한다.
이자 (Pancreas)	- 가능한 한 넓은 부위를 삭정 한다.
지라 (Spleen)	- 지라문(hilus)이 포함되도록 지라의 중간부를 가로축으로 삭정 한다.
창자간막림프절 (Mesenteric lymph node)	- 창자간막에 붙어 있는 림프절을 적당한 크기로 삭정 한다.
턱밑림프절 (Mandibular lymph node)	- 턱밑림프절 1개를 그대로 조직 제작에 이용한다.

가슴샘 (Thymus)	<ul style="list-style-type: none"> - 한쪽 엽을 길이방향으로 삭정한다. - 가슴샘이 위축되었을 때는 가슴샘 부위를 그대로 조직 제작에 이용한다.
심장 (Heart)	<ul style="list-style-type: none"> - 삭정 단면에 양쪽 심실(ventricle)을 포함해 사이막(septum), 심장꼭대기(apex), 유두근(papillary muscle) 및 중요 혈관이 나타나야 한다.
골격근 (Skeletal muscle) 궁둥신경 (Sciatic nerve)	<ul style="list-style-type: none"> - 골격근 및 궁둥신경을 분리해 세로축 및 가로축으로 삭정한다. - 골격근과 궁둥신경을 분리하지 않고 삭정하기도 하며, 1개만 삭정할 경우 가로축을 우선으로 한다.
피부 (Skin) 젖샘 (Mammary gland)	<ul style="list-style-type: none"> - 살부위 피부를 젖샘이 가장 발달한 부위에서 세로축으로 삭정한다.
혀 (Tongue)	<ul style="list-style-type: none"> - 혀의 중앙부를 세로축으로 삭정한다.
뇌하수체 (Pituitary)	<ul style="list-style-type: none"> - 먼쪽부분(pars distalis), 중간부분(pars intermedia), 신경부분(pars nervosa)이 모두 나타나도록 삭정한다.
부신 (Adrenal gland)	<ul style="list-style-type: none"> - 왼쪽, 오른쪽 부신의 약 1/3을 잘라내고 나머지 큰 조각을 조직 제작에 이용한다. - 부신의 겉질과 속질이 모두 나오게 삭정한다.
난소 (Ovary)	<ul style="list-style-type: none"> - 양쪽 난소를 그대로 이용한다.
눈 (Eye) 시신경 (Optic nerve) 하더샘 (Harderian gland)	<ul style="list-style-type: none"> - 눈에는 주변의 하더샘과 시신경, 수정체(lens)가 포함되도록 양쪽 모두를 삭정한다. 하더샘을 분리할 경우 양쪽 모두 제작에 이용한다.
비강 (Nasal cavity)	<ul style="list-style-type: none"> - 삭정 전, 충분히 탈회시킨다. - 첫 번째 입천장능선(palatine crest) 바로 뒤와 두 번째 입천장능선 중간부분을 삭정한다.

넙다리뼈 (Femur) 골수 (Bone marrow)	- 탈회 후, 넙다리뼈의 끝부위(distal), 무릎관절 및 정강뼈(tibia)가 포함되도록 세로축으로 삭정한다.
복장뼈 (Sternum) 골수 (Bone marrow)	- 탈회 후 복장뼈 중앙부를 2~3마디 이상 포함되도록 세로축으로 삭정한다.
침발샘 (Zymbal gland)	- 뇌하수체 뒷부분과 사골포(ethmoidal bullae)의 중간부분을 기준으로 하여 양쪽이 모두 포함되게 삭정한다. - 침발샘을 따로 적출한 경우에는 이개연골 등 주위 조직을 모두 제거한다.
대동맥 (Aorta)	- 가로막으로부터 약 1cm 위의 가슴대동맥(thoracic aorta)을 가로축으로 삭정한다.

<별표 2> 삭제방법표: 흡입노출경로*

장기	삭정 방법
폐 (Lung)	<ul style="list-style-type: none"> - 기관지폐포세척액검사를 실시하지 않은 모든 엽에 대해 검체제작한다. - 좌측엽(left lobe) 및 우측꼬리엽(right caudal lobe)은 길이방향의 수평으로 삭정한다. - 우측머리엽(right cranial lobe) 및 덧엽(accessory lobe)은 가로축으로 삭정한다. - 우측중간엽(cranial middle lobe)은 길이방향의 수직으로 삭정한다.
인두 (Pharynx) 후두 (Larynx)	<p>후두는 랫드는 3개, 마우스는 2개 단면을 삭정한다. 일반적으로 level 1, 2, 3으로 지칭한다. 인두는 보통 랫드의 경우 level 2, 마우스는 level 1에 포함된다. Level 3부터 2, 1의 순서로 삭정하면 용이하다.</p> <ul style="list-style-type: none"> - 랫드 <ol style="list-style-type: none"> (1) Level 1: level 2의 삭정이 완료되고 남은 조직으로 갑상인대시작점이 level 1이 된다. (2) Level 2: level 3에 이어 갑상연골이 끝나는 지점, 즉 갑상인대가 시작되기 직전 지점에서 삭정한다. 갑상연골 쪽이 level 2가 된다. (3) Level 3: 기관위치를 기준으로하여 윤상연골 시작점과 윤상갑상인대 끝 지점을 삭정한다. 윤상갑상인대쪽이 level 3 이다. - 마우스: 2개 단면을 제작한다. 랫드의 level 2, 3 부위에 해당하는 면을 제작하며 순서대로 level 1 및 2로 지칭한다.

장기	삭정 방법
기관 (Trachea)	<ul style="list-style-type: none"> - 2개의 단면을 삭정한다. (1) 가로축으로 1개 단면을 삭정한다. (2) 기관분기부(carina)가 포함되도록 세로축으로 1개 단면을 삭정한다.
비강 (Nasal cavity)	<ul style="list-style-type: none"> - 삭정 전, 충분히 탈회시킨다. - 랫드: 4개 단면을 제작한다. 일반적으로 level 1,2,3,4로 지칭한다. (1) Level 1: 앞니(upper incisors) 바로 뒤와 어금니 방향으로 필요한 조직의 두께만큼 삭정한다. 앞니 바로 뒤쪽이 level 1이 된다. (2) Level 2: 앞니유두(incisive papilla)가 포함되도록 앞니유두의 시작과 끝 부분을 삭정한다. 앞니유두의 시작부분이 level 2가 된다. (3) Level 3: 첫 번째 입천장능선(palatine crest)바로 뒤와 두 번째 입천장능선 중간부분을 삭정한다. 첫 번째 입천장능선 뒤쪽이 level 3가 된다. (4) Level 4: level 3를 삭정하고 남은 면, 즉 두 번째 입천장능선 중간부분에 이어 두 번째 어금니(second molar tooth)의 중앙 부분에서 삭정한다. 박절과정에서 손실되는 조직의 두께를 고려하여 level 4의 방향을 결정한다. - 마우스: 3개 단면을 제작한다. (1) Level 1: 랫드와 동일하게 삭정한다. (2) Level 2: level 1 삭정면에 이어 앞니유두 끝부분을 삭정한다. (3) Level 3: 두 번째 어금니 시작지점과 후각망울의 중간 지점까지 삭정한다.

* <별표 2>에서 언급하지 않은 장기·조직의 삭정은 <별표 1>을 따른다.

지침 개정 이력

□ 개정일 : 2022. 12.

- 개정자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 이미주
- 개정사유 : 관련 법규 현행화 및 최근 연구결과 반영
- 주요 개정내용
 - 호흡기의 검체 제작 정밀도 향상을 위한 가이드라인 개발(산업안전보건연구원, 2021)
관련 내용 반영