

KOSHA GUIDE

H- 83 -2021

화학물질의 급성 경피독성 시험 기술지침

2021. 10.

한국산업안전보건공단

안전보건기술지침의 개요

- 작성자 : 한국산업안전보건공단 김 종 규
- 개정자 : 한국산업안전보건공단 김 종 규
- 개정자 : 한국산업안전보건공단 김 종 규
- 개정자 : 한국산업안전보건공단 김 종 규
- 개정자 : 한국산업안전보건공단 김 종 규
- 개정자 : 한국산업안전보건공단 서 동 현
- 개정자 : 한국산업안전보건공단 조 중 래

- 제정 경과
 - 2008년 7월 산업위생분야기준제정위원회 심의
 - 2008년 8월 총괄기준제정위원회 심의
 - 2012년 5월 총괄 제정위원회 심의(개정, 법규개정조항 반영)
 - 2015년 5월 산업독성분야 제정위원회 심의(개정)
 - 2016년 10월 산업독성분야 제정위원회 심의(개정)
 - 2017년 9월 산업독성분야 제정위원회 심의(개정)
 - 2021년 9월 산업독성분야 기준제정위원회 심의(개정)

- 관련규격 및 자료
 - OECD Guideline for testing of chemicals 402 (Acute dermal toxicity)

- 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
 - 이 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 10월

제 정 자 : 한국산업안전보건공단 이사장

화학물질의 급성 경피독성 시험에 관한 지침

1. 목적

이 지침은 산업안전보건법 제105조(유해인자의 유해성·위험성평가 및 관리), 제108조(신규화학물질의 유해성·위험성 조사), 제110조(물질안전보건자료의 작성 및 제출), 고용노동부 예규 제166호(화학물질의 유해성·위험성 평가에 관한 규정) 및 국립환경과학원 고시 제2020-46호(화학물질의 시험방법에 관한 규정)에 따라, 화학물질 취급에 따른 단기간 피부노출에 의해 일어날 가능성이 있는 건강장해에 관한 정보를 제공하며 아급성 및 기타 독성시험의 용량을 결정하고 또한 경피흡수 및 경피경로에 의한 독성작용기전에 대한 정보를 제공하기 위한 급성 경피독성 시험 지침을 정함을 목적으로 한다.

2. 적용범위

이 지침은 법과 관련하여 화학물질의 단기간 피부노출에 의한 건강장해에 관한 자료제공을 위한 급성 경피독성 시험에 적용한다.

3. 용어의 정의

(1) 이 지침에서 사용하는 용어의 정의는 다음과 같다.

(가) “급성경피독성(Acute dermal toxicity)”이라 함은 시험물질을 피부에 1회 도말 하였을 때 짧은 시간 내에 나타나는 악영향을 말한다.

(나) “용량(Dose)”이라 함은 동물에 적용된 시험물질의 양을 말한다.

(다) “LD₅₀(Median lethal dose)”이라 함은 1회 투여 시 시험동물의 50 %를 치사시킬 수 있는 시험물질의 용량을 말한다.

(라) “용량-반응 관계”라 함은 규정된 영향을 보이는 시험개체의 비율과 용량과

의 관계를 말한다.

(마) “용량단위”라 함은 시험동물의 체중 당 시험물질의 중량(mg/kg)으로 표시하는 것을 말한다.

(바) “운영책임자”라 함은 시험기관 전반의 관리 운영에 대한 책임을 지는 자를 말한다.

(사) “시험책임자”라 함은 해당시험에 대한 전문지식과 경험이 있는 전문가로서 시험계획, 시행, 보고서 작성등 시험전반을 책임지는 자를 말한다.

(아) “시험동물관리 위원회”라 함은 실험동물의 적절한 사용과 관리, 동물실험과정의 윤리준수 등을 협의하는 위원회를 말한다.

(사) “순화”라 함은 사육환경조건에서 생리적으로 적응함을 말한다.

(2) 그 밖에 이 지침에서 사용하는 용어의 정의는 이 지침에 특별한 규정이 있는 경우를 제외하고는 산업안전보건법, 같은 법 시행령, 같은 법 시행규칙, 안전보건규칙, 고용노동부 예규 및 국립환경과학원 고시에서 정하는 바에 의한다.

4. 시험계획서의 작성

시험계획서를 작성함으로써 표준화되고 원활한 시험수행이 되도록 하여 시험 수행 중 발생할 수 있는 오류 발생 가능성을 사전에 최소화한다.

(1) 시험계획서 작성 시기

시험책임자는 운영책임자로부터 시험책임자로 지정된 직후부터 시험계획서를 작성한다.

(2) 시험계획서 작성 방법

시험계획서에는 표지, 시험개요, 시험세부계획이 포함되도록 한다.

5. 동물 구입 및 시험동물 선택

(1) 동물 구입 신청

시험책임자는 동물시험의 타당성 확인을 위하여 시험계획서 작성 후부터 시험 실시 전까지 실험동물관리위원회의 승인을 득하고, 시험번호, 시험물질, 동물종(계통), 주령, 동물 수, 도입 시 동물체중, 생산업자(공급업자) 등을 결정하고 구매 부서에 동물구입을 신청한다.

(2) 동물사육실 사용 관리

동물관리책임자는 동물구입이 신청되면, 해당동물이 정해진 일정에 도입될 수 있도록 구매 부서에 동물구매를 신청하고, 해당동물이 사육될 동물실을 지정하여 시험동물이 GLP (Good laboratory practice) 시험에 적합하게 사육될 수 있도록 준비하고, 사육 기간 중에는 사육되는 동물의 정보를 입력한 표지를 동물사육실에 부착한다.

(3) 동물 공급 시 주의 사항

(가) 외부에서 공급되는 동물은 시험에 들어가기 전, 검역 등의 수입절차를 거쳐야 한다.

(나) 수입검사 결과 실험동물이 부적절한 경우 시험책임자는 개개의 동물 또는 동물 모두를 교환한다.

(4) 동물성적서 관리

실험동물을 공급 받을 때는 해당동물의 유전적 특성, 미생물성적서 등을 제공받아야 한다. 제공받은 동물관련 자료의 원본은 동물관리부문에 관리하며, 신뢰성보증부문에서는 사본을 복사하여 보관한다. 동물관련 자료는 매년 초, 전년도 자료를 자료보관실로 이관한다.

(5) 동물종의 선택

특별한 사유가 없는 경우는 랫드, 토끼 또는 기니픽을 사용하고 다른 동물을 사용할 경우는 그 사유를 기록한다. 동물종별 체중범위는 랫드 : 200~300 g, 토끼 : 2.0~3.0 kg 및 기니픽 : 350~450 g 을 참고한다.

(6) 동물 수 및 성별

각 용량 군에서 상처가 없는 건강한 피부를 가진 암·수 동수의 동물을 사용한다. 각 용량 군에는 적어도 10 마리의 동물(암컷 5 마리, 수컷 5 마리)을 사용하여야 한다. 암컷은 임신한 경험이 없는 동물을 사용한다. 토끼의 경우 동물 수를 적게 사용할 수가 있다.

(7) 사육 환경조건

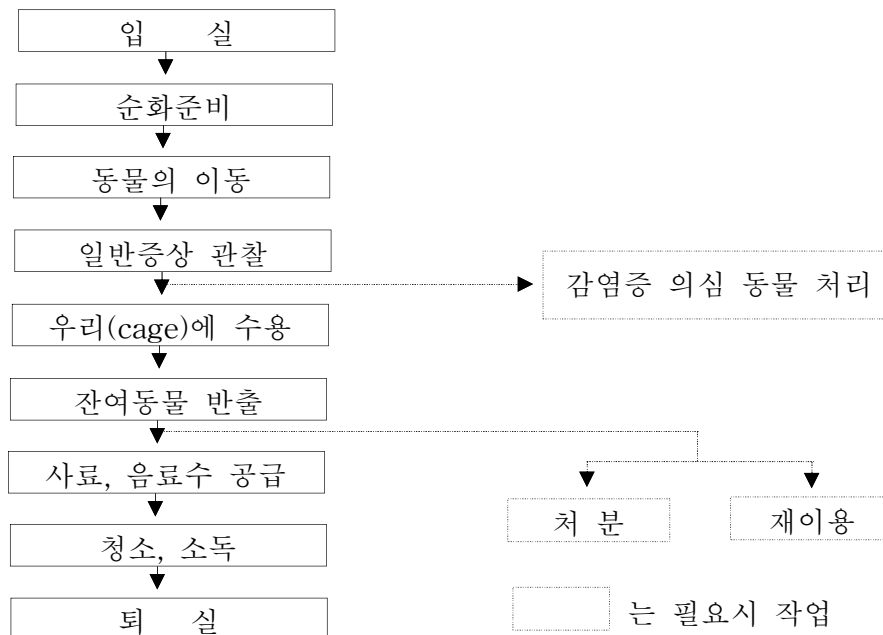
동물은 개별적으로 사육해야 한다. 시험동물실의 온도는 설치류 22 ± 3 °C, 토끼 20 ± 3 °C을 유지하고, 상대습도는 30~70 %로 하여야 한다. 조명은 인위적으로 조정할 경우 매 12시간 간격으로 점멸한다.

또한 일반실험용 사료와 함께 음료수를 자유로이 섭취시킨다.

6. 검역 및 순화

(1) 동물 순화개시일의 작업

(가) 순화개시일의 작업은 <그림1>에 따라 수행한다.



<그림1 > 동물순화개시일 작업순서

(나) 순화(Acclimatization)준비

- 1) 순화기간 중 사용되는 동물사육실에 청소 및 소독작업을 실시한다.
- 2) 자동급수용 급수관을 사용할 때는 급수관의 물을 조금 흘려 순환시킨다.
- 3) 필요한 기자재, 사육상자대, 사육우리(cage)등의 배치상태와 사육우리의 인식 번호가 바르게 되었는지 확인한다.

(다) 동물의 관찰

일반상태를 관찰하고 기록한다.

- 1) 사망 : 심장박동정지, 호흡정지, 빈사상태, 사고사망
- 2) 활동성 : 자발운동량

3) 체위 : 복와, 횡와, 배와, 원배와, 구체하수

4) 보행성 : 실조성보행, 마비성보행, 경련, 진전, 선회, 전도, 회전

5) 정서 : 세안, 흥분

6) 반응성 : 음반사 소실(증가), 촉반사 소실, 정반사 소실

7) 영양상태 : 빈삭

8) 외피상황 : 외음오염, 착색, 입모, 탈모, 외상, 외음팽윤

9) 눈과 주변 : 안구돌출, 유루, 안지, 안구혼탁, 백내장, 각막혼탁, 안방폐색, 축동, 산동

10) 발, 치아 : 발바닥 이상, 치아 결손

11) 코 : 비혈성 분비물, 비장혈성 분비물, 비점액성 분비물, 비포말성 분비물

12) 피부 : 부종, 빈혈, 황달, 치아노제, 회양, 발적, 수포, 농포, 피난, 가피, 인견, 색소침착, 백반, 반흔

13) 기타 : 출혈, 복수, 정소이상, 사경, 이상호흡, 부정호흡, 빈호흡, 호흡완화, 심호흡, 천호흡, 이상호흡음, 이상비음, 적색뇨, 황색뇨, 혈뇨, 연변, 분소립, 분소량, 혈변

(라) 감염증이 의심되는 동물발견 시 조치 사항

1) 부검을 수행하는 사람 수를 제한한다.

2) 부검장소를 최소한으로 한다.

3) 사용하는 기구를 최소한으로 한다.

4) 해부장소 및 사용한 기구는 멸균 소독한다.

5) 동물에 접촉한 사람은 소독하고 세정한다.

6) 사체에 소독 액을 분무한다.

7) 사체를 비닐봉지에 넣어 입구를 막는다.

8) 비닐봉지의 표면을 소독 액으로 분무한다.

9) 비닐봉지의 입구를 막고 냉동고에 보관한다.

(마) 잔여동물의 처리

1) 다른 시험의 예비 시험, 훈련 및 연습에 잔여동물을 사용하고자 하는 자는 잔여동물대장에서 잔여동물을 확인하고 잔여동물사용신청서에 필요사항을 기재하여 동물관리책임자의 승인을 받아 사용한다.

2) 동물관리책임자는 잔여동물 발생 1주일 이내에 잔여동물을 양도하여야 한다. 잔여동물의 용도가 1주일 이내로 결정되지 않을 경우 동물관리책임자는 잔여동물을 처분하여야 한다.

(2) 검역, 순화기간의 업무

(가) 동물의 생사 및 일반증상을 관찰한다.

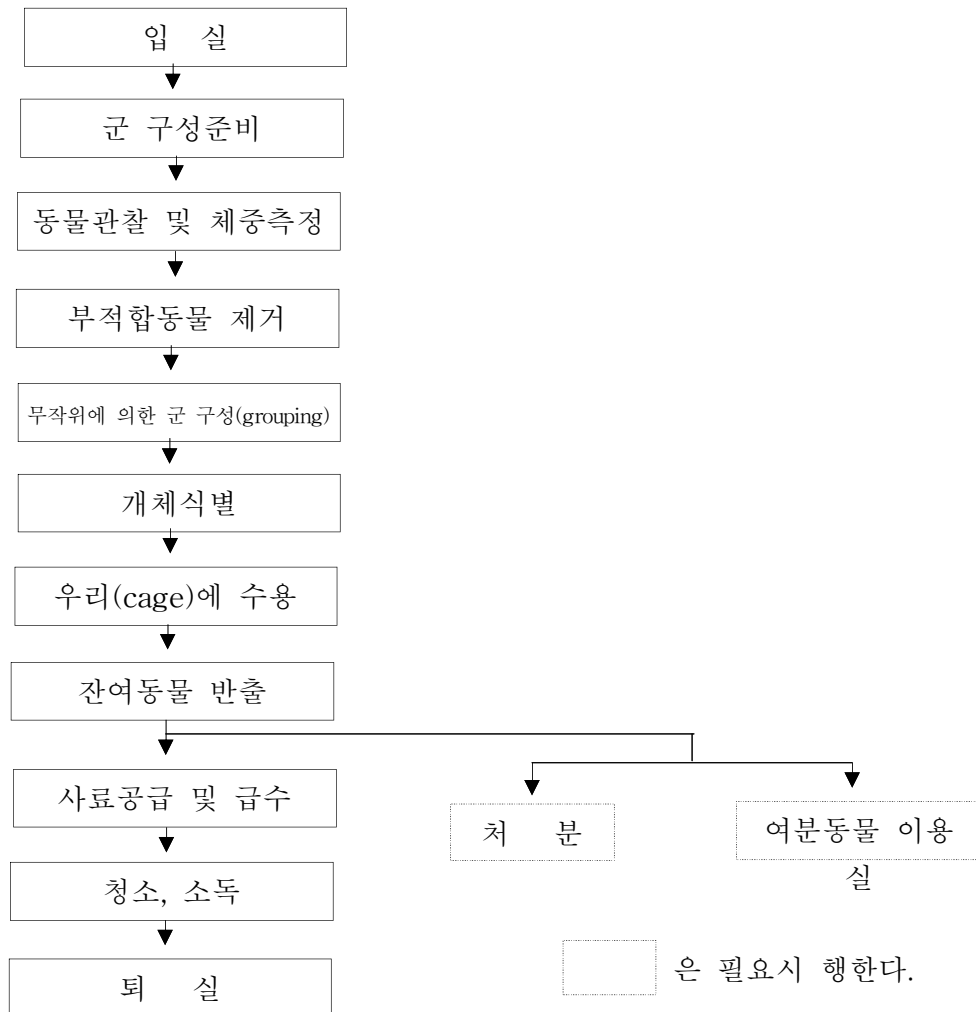
(나) 시험계획서에 따라 체중 및 섭취한 사료 및 음용수량을 측정한다.

(3) 검역 및 순화기간 종료 때의 작업

검역 및 순화가 끝나면 검역보고서를 작성하고 이를 보관한다.

7. 군 구성(Grouping)

(1) 군 구성 작업은 <그림2>에 따라 실시한다.



<그림2> 군 구성 작업 작업순서

(2) 부적합 동물의 제거

(가) 군 구성 전 증상관찰에 의하여 해당시험에 부적합하다고 판단되는 동물을 미리 제외시킨다.

(나) 동물증상기록표에 제외동물의 이유를 기록한다.

(다) 군 구성 때에 제외된 동물과 같이 반출한다.

(3) 무작위에 의한 군 구성(grouping)

체중을 기준으로 난수표등을 이용하여 무작위로 군을 구성한다.

(4) 잉여동물의 반출

(가) 군 구성 때에 제외된 동물은 번호를 확인하고 반출한다.

(나) 잔여동물의 처리

1) 해부동물로 인도할 때는 필요사항을 기록한다.

2) 해당시험의 해부담당자에 연락하여 반출동물을 해부동물인도서와 같이 인도한다.

3) 잔여동물을 따로 이용할 경우에는 잔여동물이용 기록서에 예상되는 잔여동물 자료를 기입한다. 군 구성이 끝나면 잔여동물 사용자에게 잔여동물기록서와 함께 반출한다.

8. 시험조건 및 시험방법

(1) 용량단계

용량단계를 설정하기 위하여 최소한 3단계 범위는 되어야 하며, 시험군에 어느 일정

범위의 독성효과와 사망률이 나타나도록 적절한 간격을 두어야 한다. 용량단계 설정은 용량-반응곡선을 작성하는데 충분하여야 하며, 적절한 LD₅₀가 산출될 수 있는 것 이어야 한다.

(2) 한도시험

2,000 mg/kg이상의 용량시험에서 시험물질로 인한 사망이 나타나지 않으면 3 단계 용량범위의 본시험은 필요하지 않다. 그러나 시험물질과 관련된 사망이 관찰되었을 때는 본 시험을 수행해야 한다.

(3) 관찰기간

최소한 14일간 관찰한다. 독성 반응이나 증상이 출현했을 경우, 또는 회복기간이 긴 경우는 관찰기간을 연장할 수 있다.

특히 사망이 늦게 발생하는 경우 독성징후의 출현시간, 소실시간, 사망시간을 기록한다.

(4) 시험 원리

시험물질의 용량을 여러 단계로 나누어 1군 1용량을 시험동물의 피부에 적용한 후 독성 및 사망에 대하여 관찰한다. 시험 기간 중 사망한 동물은 부검하고 시험의 종료 때는 생존한 동물도 도살하여 부검 처리한다. 동물이 심하게 지속적인 고통의 징후를 나타내는 경우는 안락사를 시킬 필요가 있다. 시험물질이 부식성과 자극성을 나타내어 동물에 현저한 고통을 일으키는 경우에는 시험할 필요가 없다.

(5) 시험물질의 투여

(가) 일반이론

1) 투여는 같은 시간에 실시하고 가능하면 오전 중에 투여한다.

2) 투여개시 전에 각 투여군의 동물번호 등 시험실시에 관련되는 시험수순을 확

인하여야 한다.

- 3) 각 시험군의 투여 전 실험동물의 체중을 측정하고 시험수순에서 특별한 지시가 있는 경우를 제외하고 저용량에서 고용량의 순으로 실시한다.

(나) 시험물질

- 1) 시험물질의 현탁액 또는 용액은 시험수순에 서술되어 있는 경우를 제외하고는 투여 당일에 조제한다.
- 2) 조제시험물질은 적어도 필요 1일 전에 조제 주문하여야 한다.
- 3) 조제시험물질은 조제 후 가능한 한 빨리 사용한다. 현탁액은 투여직전에 재현탁한다. 1개 군의 투여가 끝난 후에 다음 군의 현탁액이 공급되어야 하며, 각 군의 현탁액이 따로 공급되기 위해서는 시험물질 조제 담당자와 협력이 필요하다.
- 4) 시험물질을 수령할 때는 용기라벨이 완전한가를 확인한다. 만약 결함이 있으면 그 라벨의 시험물질은 사용하지 말아야 하고 시험책임자와 상담한다.
- 5) 투여량 및 투여물질에 관한 표지가 투여동물의 사육상자 표지, 시험수순 및 시험실시 예정표의 일치여부가 확인되어야 한다.

(다) 투여

- 1) 투여 약 24시간 전에 등 부분의 털을 전기 제모기로 깎고 면도하여 제거한다. 이때 피부에 상처를 내면 투과성에 영향을 주므로 상처가 나지 않도록 주의한다.
- 2) 시험물질을 투여하기 위해서는 전체표면적의 10 % 범위에 해당하는 투여면적에 균일하게 투여한다. 독성이 강한 물질은 도포면적을 보다 적게 하는 경우도 있으나 도포부위 전체를 가능하면 얇고 균일한 필름 상으로 넓게 피복

한다.

만일 분말상태인 고체를 시험하고자 할 경우에는 시험물질을 피부와 잘 접촉시키기 위하여 물 또는 적당한 용매를 사용하여 충분히 습윤 시켜야 한다. 용매를 사용할 경우 시험물질의 피부 투과성에 대한 용매의 영향에 대하여 고려해야 하며, 액상의 시험물질은 일반적으로 희석하지 않고 사용한다.

- 3) 시험물질은 24시간의 노출기간 중 다공성 거즈, 비자극성 테이프를 사용하여 피부와 접촉을 유지시켜야 한다.
- 4) 동물이 시험적용 부위의 시험물질을 섭취하지 못하도록 하여야 한다. 시험물질의 섭취를 방지하기 위해 보조 장비를 사용할 수 있으나 완전히 구속하여서는 안 된다.
- 5) 노출시간 종료 후 남아있는 시험물질 및 투여부위는 물 또는 적당한 용매를 사용하여 제거한다.
- 6) 투여 후 모든 동물의 임상 및 일반증상을 관찰한다.

(라) 투여 후의 순서

- 1) 시험물질의 투여에 관계하는 모든 사람은 투여 후, 해당 양식(시험기록지)에 서명하고 날짜를 기입한다.
- 2) 투여 후 모든 동물의 증상관찰 등을 상세히 관찰·기록하여야 한다.

(6) 임상검사

관찰사항은 정확하고, 계통적으로 기록한다. 또한 각 동물에 대한 개개의 기록을 남겨둔다. 시험물질을 투여한 후 첫날은 일정시간 간격으로 3회 이상 관찰하고, 그 후에는 적어도 매일 1회 주의 깊게 관찰해야 한다. 시험에서 동물의 손실을 최소화하기 위하여 매일 면밀한 관찰을 해야 한다. 사망된 동물이 확인되면 해부 및 냉장보존하고 쇠약 또는 빈사상태의 동물은 격리 또는 도살 처분한다.

동물의 증상은 체모, 눈 및 점막, 호흡기계, 순환기계, 자율신경 및 중추신경계, 전신운동능력 및 행동패턴을 포함하여 관찰한다. 또한 진전, 경련, 유연, 설사, 졸림, 수면 및 혼수 등의 증상 유무를 관찰한다. 사망한 시간은 가능한 한 정확히 기록해야 한다.

시험동물의 체중은 시험물질의 투여직전에 측정하며, 투여 후에는 매주 및 사망 시에 측정한다. 그리고 실험 종료 때는 생존동물은 체중측정을 행한 후 도살한다.

(7) 병리검사

모든 동물은 부검을 실시해야 하며 육안적 병리 변화를 모두 기록해야 한다. 육안적 병리소견을 나타내는 기관(Organ)에 대하여는 현미경 검사로 유용한 정보를 확보할 수 있기 때문에 현미경 검사 실시 여부를 판단한다.

(8) 암·수에 대한 독성평가

한쪽 성의 시험 종료 후 최소한 다른 쪽 성의 1개 군 5마리씩 각 농도군에 투여하여 다른 쪽 성의 동물이 시험물질에 대하여 특별하게 현저히 높은 감수성을 갖고 있는지 여부를 확인한다.

이때에 개개의 정확에 따라 보다 적은 동물 수를 사용할 수 있다. 어느 쪽의 성이 시험물질에 보다 높은 감수성을 갖는지 충분한 정보가 얻어지는 경우에는 다른 쪽의 시험을 생략하여도 된다.

9. 시험결과 처리 및 최종보고서 작성

(1) 결과의 처리

각 시험군마다 시험시작 때의 동물 수, 각 용량군의 개개 동물의 사망시간, 독성의 징후를 보이는 동물 수, 독성의 영향 및 부검소견 등이다. 시험물질에 의한 고통과 괴로움 때문에 동물을 안락사를 시킬 경우에는 시험물질에 의한 사망으로 기록한다. LD₅₀의 결정은 Bliss, Litchfield and Wilcoxon, Milleer and Trainter, Weil 등의 방법에 따라 구한다.

(2) 최종보고서의 내용

최종보고서에 포함되어야 할 내용은 다음과 같다.

(가) 용량군별 반응성적표 (시험기간 중에 사망 또는 도살된 동물 수, 독성의 징후를 나타낸 동물 수, 노출된 동물 수)

(나) 투여시간 및 투여후의 사망시간

(다) 지정된 측정방법으로 14일째 산출한 동물성별에 대한 LD₅₀

(라) LD₅₀의 95 % 신뢰한계 (산출될 수 있는 경우)

(마) 용량-사망률 곡선과 구배 (측정방법에 의해 가능한 경우)

(바) 병리소견 : 육안적 해부소견이 관찰된 장기조직에 대하여 필요시 병리조직 검사

(사) 다른 성에 대해 실시된 시험이 있으면 그 결과

(아) 시험물질의 명칭, 약칭 또는 코드번호, 제조번호, 또는 로트번호

(자) 투여조건에서의 시험물질의 안정성

(차) 시험계의 종, 계통, 수, 연령, 성별, 체중범위, 공급원, 공급원의 환경조건, 구입 날짜 및 사육조건

(카) 시험물질의 투여량 설정이유

(타) 시험결과의 신뢰성에 영향을 줄 수 있는 환경요인

(파) 자료의 통계학적인 해석 방법

KOSHA GUIDE
H- 83 -2021

(하) 시험성적의 고찰 및 요약

(거) 시험기초자료 및 검체 등의 보관장소

(거) 신뢰성보증증명

지침 개정 이력

□ 개정일 : 2021. 10.

- 개정자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 조중래
- 개정사유 : 산업안전보건법령 및 관련 고시 폐지 등 개정
- 주요 개정내용
 - 산업안전보건법 전면개정에 따른 변경내용 반영
 - 고용노동부 고시(화학물질의 유해성·위험성 시험 등에 관한 기준, 고용노동부고시 제2020-57호) 폐지에 따른 국립환경과학원 고시(화학물질의 시험방법에 관한 규정) 인용