

KOSHA GUIDE

W - 4 - 2021

## 화학물질의 만성독성시험 기술지침

2021. 12.

한국산업안전보건공단

## 안전보건기술지침의 개요

- 작성자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 김 현 영
- 개정자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 김 현 영
- 개정자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 김 현 영
- 개정자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 이 미 주
- 개정자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 조 은 상
- 개정자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 박 가 영

## ○ 제정 경과

- 2010년 10월 산업위생분야 제정위원회 심의
- 2010년 11월 총괄제정위원회 심의
- 2015년 5월 산업독성분야 제정위원회 심의(개정, 법규개정조항 반영)
- 2016년 10월 산업독성분야 제정위원회 심의(개정, 법규개정조항 반영)
- 2017년 9월 산업독성분야 제정위원회 심의(개정, 법규개정조항 반영)
- 2021년 11월 산업독성분야 제정위원회 심의(개정, 법규개정조항 반영)

## ○ 관련규격 및 자료

- OECD, OECD Guideline for the testing of chemicals. 2018 (TG 452, Chronic Toxicity Studies)

## ○ 관련법규, 규칙, 고시 등

- 산업안전보건법 제105조(유해인자의 유해성·위험성 평가 및 관리)
- 산업안전보건법 시행규칙 제143조(유해인자의 관리 등)
- 국립환경과학원고시 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 관련규격 및 자료, 법규 등에 관하여 최근 개정본이 있을 경우에는 해당 개정본의 내용을 참고하시기 바랍니다.

공표일자 : 2021년 12월

제 정 자 : 한국산업안전보건공단 이사장

## 화학물질의 만성독성시험 기술지침

### 1. 목적

이 지침은 시험물질을 시험동물에 장기간 노출하였을 때 나타나는 생체의 기능의 변화 관찰 등 유해성 정보를 확보하는데 그 목적이 있다.

### 2. 적용범위

이 지침은 산업안전보건법 제105조(유해인자의 유해성·위험성 평가 및 관리), 시행규칙 제143조(유해인자의 관리 등) 및 국립환경과학원 고시 제2020-4호(화학물질의 시험방법에 관한규정)에 의거 시험동물을 이용 만성독성시험방법 및 결과의 작성에 적용한다.

### 3. 용어의 정의

(1) 이 지침에서 사용하는 용어의 뜻은 다음과 같다.

(가) “만성독성”이란 랫드 또는 마우스 등을 이용, 시험동물에 시험물질을 일반적으로 12개월 동안 반복 투여하였을 때 나타나는 영향을 말한다.

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

(다) “검체”라 함은 검사나 분석 또는 보관을 위해 시험계로부터 얻어진 것을 말한다.

(라) “대조물질”이라 함은 시험물질과 비교할 목적으로 시험에 사용되는 물질을 말한다.

(마) “회복군” 이라함은 본시험에서 시험물질 투여 완료 후 시험물질에 의한 독성변화의 자연성과 회복성을 검토하기 위해 구성하는 시험동물군을 말한다.

(2) 그 밖의 용어의 뜻은 이 지침에서 특별히 규정하는 경우를 제외하고는 「산업안전보건법」, 같은 법 시행령, 같은 법 시행규칙 및 「산업안전보건기준에 관한 규칙」에서 정하는 바에 따른다.

## 4. 시험방법

### 4.1 시험동물

#### 4.1.1 시험동물의 종류 및 성별

시험에 사용되는 시험동물은 기본적으로 설치류를 사용하며, 랫드, 마우스를 사용할 수 있으나 랫드를 우선한다. 가능한 급성, 아급성 또는 아만성(90일 기준) 독성시험에서 이용한 같은 종류의 시험동물을 이용한다.

#### 4.1.2 연령

이전에 사용된 적이 없는 건강한 8주령 이내의 동물을 사용하며, 최소 7일 동안 순화기간을 가진다. 시험 시작 시 체중이 고른 것(평균체중의  $\pm 20\%$ )을 사용한다.

#### 4.1.3 사용 동물 수

암수 모두 사용하며, 시험이 끝날 때 생물학적 및 통계학적 평가가 충분한 수의 동물을 사용한다. 설치류의 경우 일반적으로 각 시험군별 군 당 암수 각각 20 마리 이상의 동물을 사용하며, 비설치류인 경우 군마다 같은 성별로 최소 4 마리를 사용할 것을 권장한다. 그러나 중간 도살을 하여 검사를 할 경우에는 그 수만큼 시험동물을 추가한다.

### 4.2 시험방법

#### 4.2.1 시험농도 설정방법

시험물질의 노출농도와 시험동물의 생체에 미치는 용량-반응의 관계를 알기 위하여 일반적으로 노출농도는 3단계 이상으로 한다. 또한, 가능한 고농도에서는 사 망

동물이 나오지 않으면서 시험물질에 의한 독성영향이 나타나는 양을 최고농도로 하고, 최저농도는 시험기간 동안에 동물에 어떤 영향도 나타나지 않는 농도로 하며, 이의 중간 값을 중간농도로 설정 한다. 그리고 시험물질은 노출하지 않으나 동일한 조건에서의 노출군과 비교하기 위한 별도의 대조군을 둔다.

#### 4.2.2 시험물질 노출방법

원칙적으로 산업현장에서 근로자의 화학물질 취급시 신체의 노출 및 흡수경로를 고려 흡입노출(전신 또는 비부)을 중심으로 한다. 부득이 경구 노출의 경우 시험물질은 사료나 음료수에 첨가하여 노출하는 것이 시험동물에 부담을 줄여 주어 좋다. 이때 사료에 첨가하는 시험물질의 농도는 5% (w/w) 이하로 한다. 또한 복강이나 경구투여의 경우 1일 1회를 원칙으로 하며, 흡입노출의 경우 근로시간을 고려 1일 6시간, 주 5일 반복하여 노출하며, 매일 일정한 시간에 노출함을 원칙으로 한다.

#### 4.2.3 시험물질 노출기간

시험물질 노출기간은 사용하는 시험동물과 시험목적에 따라 다르나 일반적으로 12개월을 원칙으로 한다.

#### 4.2.4 관찰 및 측정항목

시험 항목은 다음의 사항을 기준으로 관찰하고 측정한다.

##### (1) 일반 상태 및 사망률

적어도 1일 1회 이상 임상적 관찰을 한다. 사망동물은 즉시 부검 또는 냉장 보관 한다. 또 쇠약이나 빈사상태의 동물은 격리하거나 부검하여 원인을 확인한다. 사망 율은 물론 신경증상, 안구검사소견 등 모든 동물에 대하여 기록하고, 독성의 발현시간이나 진행상태, 종양 유, 무에 관해서도 기록한다.

##### (2) 체중, 사료 섭취량 및 물 음수량 측정

시험동물의 체중은 시험 개시 후 13주 까지는 주 1회, 그 이후는 적어도 4주 에 1 회 이상 측정하며, 사료섭취량 또는 음수량 측정에 대해서는 시험물질을 사료 또는 음수에 섞어서 투여할 때에만 측정한다. 이때 시험 개시 후 13주 까지는 매주 측정하고, 그 이후는 건강상태와 체중에 변화가 없는 한 3개월 마다 1회 이상 측정한다.

## (3) 혈액검사

## (가) 혈액학적 검사

시험동물의 혈액을 이용하여 측정하며, 측정 주기는 투여 3개월 후, 6개월 후로 하며, 투여 6개월 이상부터는 6개월 간격으로 암, 수 최소 10마리 이상에 대해 실시한다. 혈액학적 지표는 적혈구 수, 백혈구 수(전체수 및 분율), 혈소판 수, 헤모글로빈 농도, 적혈구 용적치(침전된 세포의 부피), 평균 적혈구체적(MCV, Mean Corpuscular Volume), 평균 혈구 헤모글로빈(MCH, Mean Corpuscular Hemoglobin), 평균 혈구 헤모글로빈 농도(MCHC, Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration), 프로트롬빈 시간 및 활성화트롬보플라스틴 시간 (APTT, Activated Partial Thromboplastin Time) 등을 포함한다. 하인즈 소체(Heinz body)나 다른 비정형 적혈구 형태 또는 메트헤모글로빈과 같은 다른 혈액학 지표들은 시험물질의 독성에 따라 적절히 추가하여 측정할 수 있다.

## (나) 혈액생화학적 검사

시험동물의 혈액에서 분리한 혈청을 이용하여, 측정 주기는 투여 3개월 후, 6개월 후이며 6개월 이상부터는 6개월 간격으로 암, 수 최소 10마리 이상에 대해 혈액을 채취하며 혈액 채취 전에 시험동물을 절식시키는 것이 좋다. 혈당, 유레아(요소 질소), 크레아티닌, 총 단백질, 총 콜레스테롤, 알부민, 칼슘, 나트륨, 칼륨, 2 개 이상의 간세포 평가지표(알라닌 아미노기 전이효소, 아스파테이트 아미노기 전이효소, 글루탐산탈수소효소, 총 담즙산), 2 개 이상의 간담도 평가지표(알칼린 포스파타아제, 감마 글루타밀 전이효소, 5'-뉴클레오티다아제, 총 빌리루빈, 총 담즙산), 그 외의 지표는 시험물질의 독성에 따라 적절히 측정한다. 전반적으로 시험물질 노출에 의해 관찰 및/또는 예측되는 영향에 따라 유연한 접근 방법이 필요하다.

## (4) 뇨 검사

혈액학 및 혈액생화학 지표 측정 시험과 동일한 간격으로 채집된 시료에 대해 군 당 암, 수 최소 10마리에 대해 실시한다. 외형, 부피, 삼투압 또는 비중, pH, 총 단백질 및 포도당, 케톤, 유로빌리노젠, 빌리루빈 및 잠혈 등을 포함하여 관찰된 독성영향에 대한 조사를 확장하기 위해, 필요하다면 보다 정밀한 다른 임상생화학 지표를 측정할 수도 있다.

## (5) 병리학적 검사

## (가) 육안적 관찰 및 장기 중량 측정

시험에 사용된 모든 동물(도중에 사망하거나 도살한 동물 포함)을 부검하여 각 장기별 이상 유,무를 육안관찰을 하고, 고정액에 고정시킨다.

또한 시험동물로부터 취한 뇌, 심장, 간, 비장, 신장, 부신, 부고환, 고환, 난소, 갑상선(부갑상선과 함께 측정 후 고정) 및 자궁에 대해 중량을 측정한다. 마우스를 사용하는 시험에서 부신의 무게를 측정하는 것은 선택 사항이다.

## (나) 조직학적 관찰

전자현미경적 혹은 광학현미경에 의한 병리 조직화학적 검사를 실시한다.

병리조직학적 검사는 아래의 장기에 대해서 실시하며, 최고 농도군과 대조군에 대해서 검사하는데, 고 농도군에서 조직학적 변화가 관찰된 장기에 대해서는 다른 농도군(중, 저 농도군)에서도 조직학적 관찰을 해야 하며, 특히 흡입노출의 경우 비강, 인두, 후두 및 기관지 등 호흡기는 반드시 포함되어야 한다. 쌍으로 있는 장기의 경우(예를 들어 신장, 부신), 두 개 모두 고정되어야 한다.

## &lt;검사대상 장기의 종류&gt;

그 외 병변부위, 심장, 췌장, 위(전위, 선위), 부신, 회장, 부갑상선, 치아(선택사항), 대동맥, 공장, 말초신경, 고환, 뇌(대뇌, 소뇌 및 수질/뇌교 부분포함), 신장, 뇌하수체, 가슴샘, 맹장, 눈물샘, 전립선, 갑상선, 간, 직장, 혀(선택사항), 응고선, 폐, 침샘, 기도, 결장, 림프절(표부와 심부),정낭, 방광, 십이지장, 유선(암컷에서는 필수, 수컷에서는 육안 해부 가능한 경우), 골격근, 자궁(자궁경부 포함), 부고환, 상기도(코, 비갑개 및 부비강 포함, 선택사항), 피부, 요관(선택사항), 눈(망막 포함), 식도, 척수(3단계: 경부, 중흉부 및 요추), 요도(선택사항), 관절포함 대퇴골(선택사항), 후각망울(선택사항), 비장, 질, 담낭(랫드 이외의 종), 난소, 흉골(선택사항), 골수 단면 및/또는 신선한 골수, 하더샘 등에 대해 실시한다.

## (6) 기타 필요한 사항

시험 중 사망한 동물에 관해서는 그 원인을 조사한다. 또한 시험물질 투여기간 중 임상적 상태가 매우 좋지 않아서 사망 직전에 있는 동물은 부검하여

원인을 확인하며, 기타 필요한 검사항목이나 사항에 대해서는 추가적으로 검사 할 수 있다.

### 4.3 시험결과 및 보고서 작성

#### 4.3.1 최종보고서의 포함 내용

최종보고서에는 기본적으로 아래의 사항이 포함되어야 한다.

(1) 시험의 종류, 시험물질 및 대조물질에 관한 내용

(가) 시험제목

(나) 코드 또는 명칭(IUPAC, CAS번호 등)에 따르는 시험물질의 식별

(다) 화학물질 명에 의한 대조물질의 식별

(라) 순도, 안정성, 균일성을 포함한 시험물질의 특성

(2) 시험재료와 시험방법

(가) 이용한 시험방법과 시험재료

(3) 결 과

(가) 시험동물의 종/계통/공급원, 사료 및 환경조건

(나) 시험동물의 성별 및 농도군별의 반응성적표

(다) 시험기간 중에 사망 또는 도살된 동물수, 시간, 독성의 징후

(라) 사료 및 체중에 관한 자료



KOSHA GUIDE
W - 4 - 2021

(마) 혈액학적 분석자료

(바) 혈액생화학학적자료

(사) 해부소견 및 조직병리학적 소견

(아) 통계처리방법 및 통계학적 유의성 결정 및 계산과정을 포함한 결과

(자) 결과의 평가와 고찰, 결론

(4) 참고문헌 및 기타

참고문헌, 시험결과 기초자료, 기타 필요한 자료

## 지침 개정 이력

### □ 개정일 : 2021. 12.

- 개 정 자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 박가영
- 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
  - OECD 가이드라인(만성독성시험)에 따른 내용 수정