



발암성시험의 실험동물(랫드) 생존율 향상을 위한 개선 방안

OSHRI

산업재해예방

안전보건공단

산업안전보건연구원



연구보고서

발암성시험의 실험동물(랫드) 생존율 향상을 위한 개선방안

이성배·김경문·박가영

산업재해예방

안전보건공단

산업안전보건연구원



요약문

- 연구기간 2021년 01월 ~ 2021년 11월
- 핵심단어 발암성, 실험동물, 생존율
- 연구과제명 발암성시험의 실험동물(랫드) 생존율 향상을 위한 개선방안

1. 연구배경

발암성시험은 시험계 동물의 수명을 인간 수명의 유사기간 동안 시험물질을 장기간 노출하여 발암성을 평가하는 것으로써, 랫드는 24개월, 마우스는 18개월간 시험물질을 투여(노출)하여 발암성 여부를 확인하고 있다. 우리 연구원의 흡입독성연구센터 시험시설은 2017년부터 연차적으로 발암성시험을 수행해 오고 있으며, 대조군 랫드의 생존율이 높지 않음에 따라 이에 대한 원인 분석과 지속가능한 생존율 향상 방안 마련이 필요하였다. 따라서, 본 연구에서는 랫드 발암성시험시 영향을 미치는 환경요인에 대한 분석 및 발암성시험의 실험동물 생존율을 검토하고 실험동물 생존율 향상을 위한 개선 방안을 도출하고자 하였다.

2. 주요 연구내용

○ 문헌 조사

- 문헌을 통한 국내·외 기관에서 실험동물 사육시 영향을 주는 요인 등 조사
- OECD TG 451, AAALAC-I에 따른 동물 사육, 복지환경 검토

○ 발암성시험에 대한 생존율 검토

- F344랫드를 이용한 A 물질 발암성시험의 생존율
- F344랫드를 이용한 B 물질 발암성시험의 생존율
- F344랫드를 이용한 C 물질 발암성시험의 생존율

○ 환경적 요인 측정 및 검토

- 물리학적 요인 : 동물실 및 흡입챔버 내의 온도, 상대습도, 조도, 소음 측정
- 화학적 요인 : 동물실 및 흡입챔버 내의 O₂, CO₂, NH₃, H₂S 농도 측정
- 생물학적 요인 : 음용수, 깔짚, 사료, 살충제, 살균제, 세제 등 검토
- 기타 요인 : 사육케이지, 복지물품, 작업 방법 등 검토
- 각 요인이 실험동물에게 주는 영향(생존율, 스트레스 등) 검토

3. 연구 활용방안

- 발암성시험의 생존율 감소 원인 분석 및 개선 방안 도출을 통한 동물복지 가치 향상
- 발암성시험 실험동물 생존율 향상을 위한 동물실 환경, 작업방법 등 개선 방안 도출 및 활용

4. 연락처

- 연구책임자 : 산업안전보건연구원 흡입시험연구부 연구위원 이성배
 - ☎ 042) 869. 8513
 - E-mail sblee@kosha.or.kr

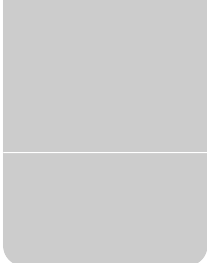
목 차

I. 서론	1
1. 연구배경	3
2. 연구목적	4
II. 연구방법	5
1. 실험동물에게 영향을 주는 요인	7
2. 생존율 분석	7
1) A 물질 발암성 시험	7
2) B 물질 발암성 시험	8
3) C 물질 발암성 시험	10
3. 환경 조건 측정	11
1) 가스상 물질 측정	12
2) 소음측정	13
3) 조도측정	13
4) 온도, 상대습도, 환기 등	14

목 차

4. 사육환경	14
1) 사료, 음용수, 깔짚	14
2) 살충제, 살균제, 세제	14
3) 복지물품	15
4) 스트레스 등	15
Ⅲ. 연구결과	17
1. 실험동물에게 영향을 주는 요인	19
1) 권장사항	19
2) 사육시설	19
3) 사육관리	20
4) 생물학적 요인	23
5) 물리적 요인	25
6) 화학적 요인	28
7) 기타 요인	31
2. 생존율 비교	32
3. 환경조건 측정	36

1) 가스상 물질	36
2) 소음	38
3) 조도	39
4) 온도, 상대습도, 환기	40
4. 사육환경	41
1) 사육시설	41
2) 사료, 음용수, 깔짚	42
3) 살충제, 살균제, 세제	42
4) 기타	43
IV. 고찰	47
V. 결론	65
참고문헌	71
Abstract	79

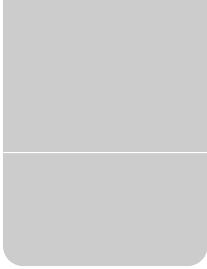


목 차

부 록	81
1. 사료 성적서	81
2. 음용수 성적서	83
3. 깔짚 성적서	84
4. 목판 성적서	91

표 목차

〈표 Ⅲ-1〉 동물실 사육상자 내의 가스상 물질 농도	37
〈표 Ⅲ-2〉 흡입챔버 내의 가스상 물질 농도	38
〈표 Ⅲ-3〉 동물실과 흡입챔버실의 소음	39
〈표 Ⅲ-4〉 동물실과 흡입챔버실의 조도	40
〈표 Ⅲ-5〉 동물실과 흡입챔버실의 온도·상대습도·환기	41
〈표 Ⅲ-6〉 발암성시험별 랫드의 치아 병변	44
〈표 Ⅳ-1〉 암·수 랫드의 생존율	51



그림목차

[그림 Ⅲ-1] 발암성시험별 랫드의 생존율	33
[그림 Ⅲ-2] 발암성시험별 대조군의 생존율 비교	34
[그림 Ⅲ-3] 발암성시험별 랫드의 체중변화	35
[그림 Ⅲ-4] 발암성시험별 대조군의 체중변화 비교	36

I. 서론

.....

I. 서론

1. 연구배경

실험동물에게 매일 일상적으로 행해지는 실험자의 작업과 여러 환경 요인은 실험동물에게 스트레스 작용을 하고, 동물 행동과 생리학적으로 영향을 미친다. 특별한 환경 조건은 스트레스 반응을 유발할 수 있으며, 실험동물이 이러한 특정 스트레스 요인이 있는 상태에 있다면 항상성을 유지할 수 없을 뿐만 아니라, 동물 복지에도 영향을 미치고 고통을 겪을 수 있다(Stark et al., 2001; Castelharo-Carlos et al., 2009).

실험동물은 평생 동안 갇혀 있게 되므로 과학적 목적을 방해하지 않는 범위 내에서 동물의 복지를 위해 노력해야 한다. 실험동물의 복지와 관련하여 사육환경, 수용밀도, 사육 케이지 크기 및 형태 등의 사육시설, NH₃ 및 CO₂ 수준 등의 화학적 요인, 조도, 소음, 환기, 온도, 상대 습도 등 물리학적 요인, 냄새, 병원체의 존재 또는 부재 등의 생물학적 요인, 그리고 작업자의 작업방법 및 숙련도 등과 같은 요인이 있으며, 이러한 요인들의 상호 작용은 성별, 환경의 예측 가능성 및 제어 가능성만큼 중요하다(Robert et al., 2006; Castelharo-Carlos et al., 2009). 환경적으로 많은 변수가 존재하지만, 과학적 목적으로 랫드를 수용하고 돌보는 시설의 유지관리에 적합한지 확인하기 위하여 OECD Test Guideline에서는 온도, 습도, 산소농도, 이산화탄소 농도, 소음, 조도 등 사육환경에 대한 사항에 대해서 기준을 제시하고 있다(OECD, 2018). 이외에도 동물사육관리에 있어서 생물학적 요인, 화학적 요인에 의한 동물에 영향, 작업방법 및 숙련도에 따라서 스트레스를 유발할 수 있으며, 질병 감염 등으로 인한 생존율 감소도 초래할 수 있다.

2. 연구목적

우리 연구원의 흡입독성연구센터 시험시설은 2015년도 12월에 완공하여, 2016년도에 급성 흡입독성시험, 아급성 흡입독성시험, 그리고 아만성 흡입독성시험을 거쳐 2017년부터는 연차적으로 발암성시험을 수행해 오고 있다. 이에 따라 흡입독성연구센터에서 수행하고 있는 발암성시험에 대하여 랫드 사육지침에 따라 잘 관리되고 있는지, 환경적 요인의 영향은 없는지 확인이 필요하다. 그리고 수컷 랫드의 생존율이 높지 않음에 따라 생존율과 관련된 요인은 무엇인지에 대한 분석과 지속가능한 생존율 향상 방안 마련이 필요하다. 따라서, 본 연구에서는 먼저 실험동물 사육관리에 대한 지침 및 랫드를 이용한 발암성 시험시 환경관리에 대한 연구 결과들을 검토하고, 지금까지 수행해 온 발암성 시험의 생존율과 실험동물에게 영향을 미치는 요인들을 분석하고자 하였다. 이를 토대로, 우리 연구원 흡입독성연구센터에서 랫드 발암성시험 수행시 실험동물 생존율 향상을 위한 개선방안을 도출하고자 한다.

Ⅱ. 연구방법

.....

II. 연구방법

1. 실험동물에게 영향을 주는 요인

실험동물은 환경의 여러 요인 또는 환경 변화에 반응하고, 이러한 반응은 실험결과에 영향을 미칠 수 있다. 따라서, 환경 요소가 생물학적 과정에 미칠 수 있는 영향을 파악하기 위하여 실험동물 사육 가이드라인과 실험동물에게 영향을 주는 요인에 대하여 검토하였다.

2. 생존율 분석

산업안전보건연구원 산업화학연구실에 만성흡입독성센터를 건립하여 연차적으로 수행한 물질 A, B, C 발암성 시험 3건¹⁾에 대한 실험동물의 생존율을 분석하였다.

1) A물질 발암성 시험

A물질에 대하여 발암성시험을 수행하였으며 주요내용은 아래와 같다.

▪ 시험일정

실험동물 입수일	2017년 10월 27일
시험물질 노출기간	2017년 11월 08일~2019년 11월 07일
실험동물 부검일	2019년 11월 08일~ 2019년 11월 15일

1) 2021년도 10월 기준으로 A 물질 발암성시험은 최종보고서 작성단계에 있으며, B 물질 발암성시험은 병리보고서 작성단계에 있고, C 물질 발암성시험은 흡입 노출실험 진행 중에 있다.

■ 실험동물

종	랫드(특정병원체부재 (Specific Pathogen Free, SPF))
계통/아계통	F344/N Slc
입수동물수	436마리(수컷 218마리, 암컷 218마리)
노출동물수	400마리(수컷 200마리, 암컷 200마리)
주령범위	약 5주령 입수, 투여개시 시 약 7주령

■ 실험동물 사육 관리

시험물질 노출 및 비노출 기간 모두 공기조화 설비가 별도로 장착되어 동물실과 분리된 전신노출 흡입챔버(Whole-body Inhalation Toxicity Chamber, WITC-50-M, HCT Co., Korea) 내의 철망 케이지에서 실험동물을 관리하였다. 체중 측정 시에는 철망 케이지를 동물실로 이동하여 체중을 측정한 다음 다시 흡입챔버 내로 옮겨서 실험을 수행하였다. 동물실 청소 및 소독시에는 흡입챔버 내에 동물이 수용되어 세척제 또는 소독제의 영향을 받지 않는 시간에 수행하였다.

■ 실험동물 생존율

A물질의 흡입노출 2년간의 암·수 동물을 구분하여 Kaplan-Meier(Kaplan and Meier, 1958)의 product-limit estimator test로 생존율을 분석하였다. 첫 부검 개시일을 계획도살일로 결정하고, 부검개시일 이후에 사망한 동물은 부검일에 사망한 것으로 간주하였다.

2) B물질 발암성 시험

B물질에 대하여 발암성시험을 수행하였으며 주요내용은 아래와 같다.

■ 시험일정

실험동물 입수일	2018년 09월 05일
시험물질 노출기간	2018년 09월 19일~2020년 09월 08일
실험동물 부검일	2020년 09월 09일~ 2020년 09월 17일

■ 실험동물

종	랫드(특정병원체부재 (Specific Pathogen Free, SPF))
계통/아계통	F344/N Slc
입수동물수	440마리(수컷 220마리, 암컷 220마리)
노출동물수	432마리(수컷 216마리, 암컷 216마리)
주령범위	약 5주령 입수, 투여개시 시 약 7주령

■ 실험동물 사육 관리

시험 시작일 부터 69주차까지는 시험물질 노출 및 비노출 기간 모두 공기 조화 설비가 별도로 장착되어 동물실과 분리된 전신노출 흡입챔버 내의 철망 케이지에서 실험동물을 관리하였다. 이 기간 동안 체중 측정 시에는 철망 케이지를 동물실로 이동하여 체중을 측정한 다음 다시 흡입챔버 내로 옮긴 후 실험을 수행하였다.

시험 시작 후 70주차부터 노출 종료까지 비노출 시간은 동물실의 폴리선폰 사육케이지에서 2~3마리씩 수용하여 관리하였고, 익일 오전에 시험물질 노출 전에 다시 흡입챔버 내 철망 케이지에 개별 수용하여 흡입 노출 실험을 수행하였다. 또한, 체중 측정은 폴리선폰 케이지 내의 동물을 체중 측정한 다음 흡입챔버 내 철망 케이지에 옮긴 후 실험을 수행하였다.

동물실 청소 및 소독시에는 흡입챔버 내에 동물을 수용하여 세척제 또는 소독제의 영향을 받지 않는 시간에 작업을 수행하였다. 시험 시작일 부터 동물의 발병 변 방지와 복지를 위하여 철망 케이지에 동물 복지물품(대형 목판)을 공급하였다.

■ 실험동물 생존율

B물질의 흡입노출 2년간의 암·수 동물을 구분하여 Kaplan-Meier의 product-limit estimator test로 생존율을 분석하였다. 첫 부검 개시일을 계획도살일로 결정하고, 부검개시일 이후에 사망한 동물은 부검일에 사망한 것으로 간주하였다.

3) C물질 발암성 시험

C물질에 대하여 현재 발암성시험을 수행 중에 있으며 주요내용은 아래와 같다.

■ 시험일정

실험동물 입수일	2019년 11월 13일
시험물질 노출기간	2019년 11월 27일~2021년 11월 26일
실험동물 부검일	2021년 11월 29일~ 2021년 12월 17일

■ 실험동물

종	랫드(특정병원체부재 (Specific Pathogen Free, SPF))
계통/아계통	F344/N Slc
입수동물수	480마리(수컷 240마리, 암컷 240마리)
노출동물수	480마리(수컷 240마리, 암컷 240마리)
주령범위	약 5주령 입수, 투여개시 시 약 7주령

■ 실험동물 사육 관리

시험물질 노출기간에는 공기조화 설비가 별도로 장착되어 동물실과 분리된 전신노출 흡입챔버 내 철망 케이지에서 관리하였으며, 시험물질 노출 종료 후 비노출 기간에는 동물실의 폴리선폰 사육케이지에서 2~3마리씩 관리하였고, 익일 오전에 시험물질 노출 전에 다시 흡입챔버 내 철망 케이지에 개별 수용하여 실험을 수행하였다. 또한, 체중 측정 시에는 폴리선폰 케이지 내의 동물을 체중 측정한 다음 철망 케이지에 옮겨 실험을 수행하였다.

동물실 청소 및 소독시에는 흡입챔버 내에 동물을 수용한 후 세척제 또는 소독제의 영향을 받지 않는 시간에 실시하였다. 동물의 발병변 방지와 복지를 위하여 철망 케이지에는 동물 복지물품(대형 목판)을 공급하였다.

▪ 실험동물 생존율

C물질 발암성시험의 경우 2021년도 11월말까지 흡입노출시험이 진행되기 때문에, 2021년도 10월까지 생존한 동물 수에 대해서 Kaplan-Meier의 product-limit estimator test로 생존율을 분석하였다.

3. 환경조건 측정

산업화학연구실의 흡입독성시험은 우수실험실운영(Good Laboratory Practice: GLP) 기준에 의하여 수행하였다. 흡입챔버 내 환경조건은 OECD TG(2018)를 기준으로 하였으며, 전신노출 흡입챔버(5.0 m³) 통합제어 프로그램(ITC Manager, HCTM Co. Ltd., Korea)을 이용하여 30분 간격으로 측정하였다. 아래의 항목 이외의 환경조건은 현재 진행 중인 C물질 발암성 시험을 대상으로 흡입챔버 및 사육상자에서 추가로 측정하였다.

항 목	범 위
온도(℃)	22 ± 3
상대습도(%)	50 ± 20
환기회수(회수/시간)	10~15
산소농도(%)	≥ 19

1) 가스상 물질 측정

▪ 측정기기

모델명	Wandi GAS Tiger 2000
측정가스	O ₂ , CO ₂ , NH ₃ , H ₂ S
정밀도	측정값의 3%
유량	0.6L/LPM
허용압력	86~106 kPa

▪ 측정방법

흡입챔버와 폴리설펜 사육상자에 대하여 가스상 물질을 측정하였다. 흡입챔버의 경우 노출 실험을 실시하기 전에 대조군과 저농도 노출군 흡입챔버에서 수행하였으며, 흡입챔버 중앙에 위치한 6연식 철망케이지(W240×L1,200×H200 mm)의 동물 호흡기 위치에 측정장치 튜브를 연결하고 30초 간격으로 5분간 측정하였다.

동물실의 6단 케이지랙에 폴리설펜 사육상자(W310×L500×H200 mm)를 장착하였으며, 대조군의 1단, 3단, 5단에 위치한 폴리설펜 사육상자 하나씩 선별하여 뚜껑 상부의 뚫려진 공간으로 측정장치 튜브를 사육상자 내부로 연결하고 30초 간격으로 5분간 측정하였다.

산소와 이산화탄소의 경우 측정단위는 %이며, 암모니아와 황화수소의 측정단위는 ppm이다. 아울러, 가스상 물질을 측정하는 시간에 동물실과 흡입챔버실의 환경치를 확인하였다.

▪ 측정주기

흡입챔버 청소주기 및 사육상자 교체 주기는 7일 간격이다. 흡입챔버 청소주기 및 사육상자 교체 주기에 따른 수치를 측정함으로써 실험동물의 사육 환경을 검토하고자 하였다.

흡입챔버 내의 환경의 경우 청소한 날을 0일차로 정하고 다음 청소일 청소 직전까지 측정하였으며, 0일차, 1일차, 3일차, 5일차, 7일차에 가스상 물질을

측정하였다. 폴리설푼 사육상자의 경우 교체한 날을 0일차로 정하고 다음 케이지를 교체하는 날 교체 직전까지 측정하였으며, 0일차, 1일차, 2일차, 4일차, 6일차, 7일차에 가스상 물질을 측정하였다.

2) 소음측정

▪ 측정기기

모델명	PEAKTECH 5035, Germany
측정범위	A/C Lo 35~100 dB / A/C Hi 65~130 dB
정확도	± 3.5 dB

▪ 측정방법

흡입챔버실과 동물실을 구분하여 소음을 측정하였다. 흡입챔버실에서는 대조군과 노출군 챔버실이 분리되어 있으므로 따로 측정하였으며, 각 실의 중앙 위치에서 각 3회 반복하여 측정하였다. 아울러 흡입챔버 개폐시 충격소음에 대해서도 3회 반복하여 측정하였다. 동물실에서는 폴리설푼 사육상자가 장착된 케이지랙이 있는 대조군과 노출군 동물실의 중앙 위치에서 각 3회 반복하여 측정하였다. 모든 측정값은 평균과 표준편차 값으로 기록하였다.

3) 조도측정

▪ 측정기기

모델명	TOKYO Photo-electric ANA-F9, Japan
측정범위	20~20,000 Lux
정확도	$\pm 6\%$

■ 측정방법

흡입챔버실과 동물실을 구분하여 조도를 측정하였다. 흡입챔버실에서는 대조군과 노출군 챔버실이 분리되어 있으므로 따로 측정하였으며, 각 실의 중앙 위치에 90 cm 높이의 작업대에 조도계를 올려놓은 다음 각 3회 반복하여 측정하였다. 또한 대조군과 노출군 챔버실에서 각각의 흡입챔버 최상단과 최하단 위치에서 각 3회 반복하여 측정하였다. 동물실에서는 폴리설폰 사육상자를 장착한 6단의 케이지랙 최하단인 1단과 최상단인 5단 위치에서 각 3회 반복하여 측정하였다. 모든 측정값은 평균과 표준편차 값으로 기록하였다.

4) 온도, 상대습도, 환기 등

청정실 내부의 각 실험실 온도와 상대습도, 그리고 환기는 구역별로 관리되고 있다. 이중에서 발암성시험 구역의 동물실과 흡입챔버실에 대한 온도, 상대습도, 시간당 환기 횟수를 측정하였다. 흡입챔버 내의 온도, 상대습도, 환기의 경우는 별도의 공조시스템으로 관리되고 있기 때문에 분리하여 측정하였다. 모든 측정값은 평균과 표준편차 값으로 기록하였다.

4. 사육환경

1) 사료, 음용수, 깔짚

동물실험에 있어서 가장 필요하고 중요한 사료, 음용수, 깔짚에 대하여 입수 및 검사, 사용시에 오염 등의 문제점이 없는지 검토하였다.

2) 살충제, 살균제, 세제

Class 10,000 청정실의 바닥과 벽을 주기적으로 청소하고, 기자재 등을 청정실에 반입시 소독을 한다. 이 때 사용하는 살균 소독제인 파콤-A, 브롬셋트, 70% 에탄올에 대하여 검토하였다.

3) 복지물품

실험동물에게 제공되는 복지용품에 대하여 건강에 유해한 유해물질이나 미생물 등을 함유 유무 등 사용시 문제가 없는지 검토하였다.

4) 작업자 요인 및 기타 스트레스

실험동물에게 스트레스를 주는 여러 요인이 있는데, 이중에서 동물 운송에 따른 스트레스와 작업자의 작업방법 등에 대하여 검토하였다.

Ⅲ. 연구결과

.....

III. 연구결과

1. 실험동물에게 영향을 주는 요인

실험동물 환경관리에 대한 연구는 1960년대 초부터 수행하여 왔으며, 수십 년에 걸쳐 수많은 환경변수들이 실험동물의 생물학적 반응에 중대한 영향을 미칠 수 있는 증거들을 축적하였다. 동물의 건강과 복지에는 사육 케이지 설계 및 재료, 깔짚, 사료와 음용수, 생활하는 공간, 환기 및 공기의 질(상대습도, 암모니아, 이산화탄소 등), 온도, 조명이 포함된다. 세부 내용은 ARRP Guideline 20²⁾ 및 「The Laboratory Rat」의 ‘Chapter 10. Housing and Environment’ 등을 참고하였다.

1) 권장사항

과학적 목적으로 랫드를 사용하는 기관은 랫드를 수용하고 돌보는 시설이 유지 관리에 적합한지 확인하기 위하여 기관 내 동물윤리위원회의 권장 사항에 적극적으로 임해야 할 책임이 있다. 이에 따라 실험동물이 사회적 상호작용과 정상적인 행동을 할 수 있는 사육시설(housing)이 제공되어야 한다.

실험 절차에 있어서 이러한 요구사항을 충족 할 수 없는 경우에는 랫드의 생리적, 심리적 요구를 가능한 한 가깝게 충족할 수 있는 사육시설이어야 한다.

2) 사육시설

▪ 사육환경

동물실험에 사용되는 설치류(랫드)는 야생 설치류의 자연 서식지와 현저히

2) Animal Research Review Panel Guideline 20 : 실험실 및 과학연구소 등의 랫드 사육에 대한 지침

다른 환경에서 사육되고 있다. 일반적으로 자연 환경과 다른 주요 특징은 작은 케이지에서 사육된다는 것이다. 전형적인 설치류 케이지는 환경 자극이 거의 없는 다소 건조한 환경이다. 동물의 자연적 환경에 비해 작은 크기의 케이지는 사회적 상호 작용과 먹이 찾기, 포식자 피하기, 쾌적한 기후 조건의 환경 찾기와 같은 문제 해결을 위한 동물의 활동을 제한한다. 현재 동물실의 설치류 케이지 시스템은 일반적으로 동물의 자연 환경을 모방하는 것보다 시설과 동물 관리자의 작업을 더 염두하고 설계되었다. 이러한 요인은 일반적으로 장비의 비용, 동물실의 공간, 동물 관리자와 작업자의 업무량, 인간과 동물의 위생 측면, 동물 통제 및 관찰과 관련이 있다(Baumans and van de Weerd, 1996).

■ 시설설계

동물시설은 사람이 사용하는 사무실, 실험실 및 기타영역과 물리적으로 분리되어야 한다. 실험실간 동선이 최적화되어야 하고 청정구역과 오염구역간의 교차오염을 최소화하는 방식으로 배치되어야 한다. 해충이 숨을 수 없도록 일체형 벽과 바닥 및 천장 마감재로 구축하는 것이 필요하다. 동물실은 전체적으로 매끄럽고 단단하며 불침투성 표면을 가져야 하며 노출된 조인트나 균열이 없어야 한다. 랫드 동물실에는 바닥 배수구가 없어야 하며, 만약에 있다면 설치류가 빠지지 않도록 안전 장치가 있어야 한다. 청소 중 교차오염을 방지하기 위해 오염된 지역에서 일하는 직원과 질병에 걸린 동물을 특별히 주의하여야 한다.

3) 사육관리

■ 사육케이지

사육 케이지의 경우 체중이 250~300 g인 랫드 5마리로 구성된 그룹의 최소 바닥면적은 1,500 cm²이며, 1,800 cm²가 바람직하다. 사육 케이지의 높이는 랫드가 뒷다리를 완전히 뻗을 수 있는 높이여야 하며, 높이는 케이지의 전체 영역에 포함할 필요는 없다. 체중 250~300 g인 랫드의 경우, 케이지 높이는

22 cm를 제공해야 한다. 철망케이지 사용의 경우 이를 사용해야 한다는 근거로 동물 윤리위원회의 명시적인 허가를 받지 않는 한 사용해서는 안된다. 만약 사용할 경우 단단한 바닥에 안식할 수 있는 재료가 제공되어야 한다. 아울러, 철망 메쉬 간격은 11 mm×11 mm를 초과하지 않아야 한다. 사육 케이지의 경우에서 깔짚은 케이지 전체 바닥을 덮을 수 있을 만큼 충분해야 하며, 깔짚의 깊이는 랫드 마리 수와 청소 빈도와 같은 요인에 따라 달라지는데, 일반적으로 최소 2 cm이상이어야 한다. 깔짚은 먼지, 미생물, 기생 또는 화학적 오염물질, 비외상성, 습기 흡수 및 암모니아 가스가 포함되지 않아야 한다.

사육 케이지는 내구성, 화학적으로 불활성인 폴리카보네이트 또는 폴리프로필렌으로 제작하며, 내열성이 우수한 폴리설편 등의 플라스틱 케이지로 성형되고 있다. 그러나 플라스틱 케이지(폴리카보네이트, 폴리설편)는 에스트로겐 활성을 갖는 내분비 교란물질로 밝혀진 비스페놀A(BPA)가 포함되어 있다. 폴리카보네이트 케이지는 알칼리성 세제를 사용하여 세척할 경우 더 많은 BPA를 수용액으로 방출한다.

케이지 청소는 유지보수 및 청소 작업을 위해 지정된 별도의 공간에서 수행해야 한다. 동물 활동의 영향을 최소화하기 위해 세척구역은 랫드를 수용하는 동물실 근처에 위치해서는 안된다.

■ 격리 케이지

개별 환기 케이지 시스템(Individually ventilated caging systems, VCSs)은 암모니아 발생이 지연된다. 따라서 케이지 교체빈도를 1~2주에 한번 또는 경우에 따라 더 긴 기간으로 늘릴 수 있다. 케이지 교체 사이의 기간을 늘리면 동물실 및 케이지 세척시 깔짚 사용량이 감소하며 사육 절차 및 케이지 위생과 관련된 세척제, 소독제 등의 화학물질 사용도 줄일 수 있다.

암모니아(NH_3) 농도 20 PPM(농림축산검역본부, 2020), 이산화탄소(CO_2) 농도 5,000 ppm을 기준으로 케이지 교체를 권장한다.

케이지가 완전히 밀봉되지 않은 경우에는 전원이 차단되거나 환기 시스템에 장애가 있어도 동물에게 즉각적인 위험에 처하지는 않는다. 그러나, 완전히 밀폐된 시스템에서 이러한 문제가 발생하면 환경 조건이 급격히 악화되어 동물이 죽을 수 있다. 환기가 되지 않은 경우 17분이라는 짧은 시간에 동물이 사망하기도 하였다(Kanzaki et al., 2001). 따라서, 정전으로 인한 동물의 손실을 방지하기 위해 비상 백업 전원을 설치하여 환기 시스템이 곧바로 재가동될 수 있도록 해야 한다.

환기의 또 다른 이유는 설치류가 생성하는 공기 알레르기 항원을 제어하는 것이다. 이러한 알레르기는 동물 관리자 및 연구원에게 심각한 알레르기 질환을 일으킬 수 있다. 국제 실험동물 관리 평가인증 협회(Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care - International ; AAALAC-I)는 알레르기 노출에 대한 위험평가를 수행하는 것을 권고하였다. 이러한 알레르기 항원에 대한 작업자의 노출을 줄이기 위해 여러 방식이 사용된다. 실내 환기율 증가, 사육케이지 상단에 필터 사용, 음압 환기, 환기교체 케이지 사용, 환기 유량 증가, 개인보호구 착용 등으로 알레르기를 유발하는 동물로부터 작업자를 보호할 수 있다.

▪ 수용 밀도

케이지를 새로 변경하면 정상적인 상태로 돌아오기까지 음용수와 사료섭취의 경우 최소 3일에서 5일의 시간이 필요하다. 케이지 크기는 랫드의 발 병변에 영향을 미치기도 한다. 수용 면적은 케이지 바닥 면적당 동물의 수로 나타내는데, 수컷 랫드에서는 케이지 수용 면적이 성적 행동에 영향을 미치며, 면적이 증가함에 따라 사정횟수가 증가하였다(Saito et al., 1996). 랫드 케이지 최적의 수용은 최대 4마리이며, 개체간의 차이, 신장, 성별, 케이지 크기와 같은 요소도 고려해야 한다.

▪ 개별사육 및 집단사육

실험동물이 개별사육 될 경우 동물의 변형, 성별, 그리고 연령에 영향을 받는다. 사회적 결핍에서 가장 결정적인 요인은 결핍기간 동안의 연령이나 발달 단계인 것으로 보인다(Brain and Benton, 1979; 1983).

집단사육의 경우 계급구조를 형성하게 되며, 동물의 수만큼 선형적으로 계급이 존재한다(Militzer and Reinhard, 1982; Lundberg, 1986; Schuhr, 1987). 사회적으로 고립되어 사육된 랫드는 외부에서 사회적으로 키운 랫드보다 더 탐색적, 신경질적, 공격적, 그리고 과잉 활동적이었다. 따라서, 실험동물의 사육 및 환경조건이 연구결과에 상당한 영향을 미칠 수 있다. 집단사육시 랫드는 사춘기에 도달하기 전에 집단화하여 서로 익숙하지 않은 개체간의 공격성 문제를 피하거나 최소화해야 한다. 익숙하지 않은 성인 수컷 랫드를 혼합할 경우 혼합되기 전에 케이지 배치를 가까이 하여 시각적 및 후각적 접촉이 가능하도록 하여야 한다.

▪ 개체식별

랫드를 개별적으로 식별할 필요가 있는 경우 최소 침습적 방법을 사용해야 한다. 피부와 꼬리에 무독성 염료 및 영구 마커를 사용할 수 있다. 만약, 영구 식별이 필요한 경우 피부 속에 마이크로 칩, 문신 또는 귀 노칭을 사용할 수 있다. 이러한 유형의 식별을 적용하는 것과 관련하여 일시적인 통증이 있게 되며 이 경우 마취 또는 진통제의 사용을 고려해야 한다. 발가락과 꼬리 끝 절단은 고통스러운 절차이므로 사용해서는 안된다.

4) 생물학적 요인

▪ 사료

사료의 가장 중요한 환경요인 중은 하나는 적절한 영양을 제공하는 것이다(Knapka, 1999). 동물의 영양소의 양과 질, 외부 물질의 존재에 따른 변화가 적지 않으며, 실험 변수와 상호 작용하여 원치 않는 결과를 야기할 수 있

다. 따라서 가능한 한 최상의 품질의 사료를 제공해야 한다. 기관의 동물윤리 위원회로부터 특별한 허가를 받지 않는 한 사료와 음용수는 자유롭게 제공해야 한다.

■ 음용수

실험동물에게 제공되는 음용수는 시설의 지리적 위치와 지역에 따라 상당한 차이가 있다. 산업, 농업 또는 도심지와 근접한 지하수인지, 수 처리 방식은 어떠한 유형인지에 따라 다르다. 트리할로메탄이 오염물의 가장 큰 부분을 차지하는데, 이는 염소로 소독하는 거의 모든 음용수에서 발견된다. 이 경우 클로로포름이 상대적으로 높은 농도로 나타난다(Vessel et al., 1976). 질산염으로 오염된 물질은 잠재적으로 발암성이 우려된다. 염소로 처리된 물은 돌연변이를 유발할 수 있으며, HMEs(Hepatic Microsomal Enzymes; 간 미세소체 효소)를 유발할 수도 있다(Douglas et al., 1986; Liimatainen et al., 1988). 실험용 랫드는 미네랄 필요량의 100%가 포함된 사료를 먹기 때문에 미네랄이 포함된 음용수가 제공되면 함량이 변경될 수 있다. 따라서 동물에게는 정제된 음용수를 제공한다. 가장 잘 사용되는 정수 공정은 역삼투압식 방법으로 pH 2.5~3.5로 산성화하여 미생물 오염을 제거하는 것이다.

■ 깔짚

깔짚은 소변 및 기타 수분을 흡수하고 설치류의 안식처 재료로 활용된다. 깔짚 교체의 필요성은 사용되는 깔짚의 종류와 공기질에 따라 다르다. 일반적으로 깔짚은 일주일에 한번정도 교체한다. 케이지 내의 암모니아 수준을 20 ppm미만으로 유지해야하기 때문이다.

암모니아의 흡수 능력이 높고 설치류의 배설물 외에 병원체, 방부제 및 살충제와 같은 유해한 물질에 오염되지 않아야 한다. 작은 크기(1.2×1.6 mm)의 깔짚은 깔짚 자체적으로 포함된 미량의 오염물질로 인하여 실험동물에게 영향을 미칠 수 있으므로 피하는 것이 좋다. 나무에서 잘려서 고엽제로 오염되

있을 수도 있으며, 옥수수 속대의 경우는 살충제를 뿌린 밭에서 공급되었거나, 화학물질로 오염된 것일 수도 있다. 이러한 나무 및 옥수수 속대의 깔짚은 열처리를 통하여 곰팡이 등의 오염원을 제거하여 사용할 수 있다. 옥수수 속대는 설치류의 깔짚으로 널리 사용된다. 왜냐하면 암모니아를 흡수하는 능력이 좋고 좀 더 오랜 기간 동안 사용할 수 있는 장점을 가졌다(Ras et al., 2002). 다만, 생식 호르몬에 영향을 주어 생식효율이 떨어지는 단점이 있기 때문에 생식독성 연구에서는 사용하지 말아야 한다.

5) 물리적 요인

주변온도, 상대습도, 환기, 빛, 소리, 진동, 기압, 중력, 전기 및 자기장, 전리방사선, 취기, 미생물, 기생충, 먼지 등 수많은 요인이 실험절차에 대한 동물의 반응에 영향을 미칠 수 있다(Clough, 1982). 화학물질 및 기타 오염물질들 중에서 황, 습도 및 환기는 특히 중요한 환경변수이다.

■ 온도

랫드 사육시설의 실내온도 범위는 20~26℃가 권장된다. 실내 온도의 큰 변동은 피해야 하며, 랫드의 체온 조절 능력이 손상되는 상황이 발생하지 않도록 특별한 주의를 기울여야 한다.

Clough(1982)는 VCSs 케이지 내 온도의 경우 케이지 높이에 따라 달라졌다고 하였다. 상단의 케이지는 하단의 케이지보다 4.9℃ 더 높았으며, 케이지 내는 최대 5.7℃ 더 높았다고 하였다. 온도는 살아있는 생체에 영향을 미치는 가장 중요한 환경요인 중에 하나이며, 랫드는 10~30 ℃에 적응할 수 있다. 그러나 급격한 온도변화는 피해야 한다. 31 ℃이상의 높은 주변온도에 노출 되면 수컷 랫드의 고환 위축 또는 사망까지 초래할 수 있으며, 암컷의 경우 수유를 못하게 된다(Krynicky and Olszewski, 1989; Joseph et al., 1991; Yamamoto et al., 1999).

■ 상대습도

랫드 사육 환경 관리시 상대습도는 40~70%를 권장한다. 사육상자 케이지의 경우 동물에 의해서 물이 배출되기 때문에 습도가 실내보다 더 높을 수 있다. 습도는 동물의 체온조절 능력과 공기 중 질병의 통제 및 관리에 영향을 미친다. 케이지의 높은 습도는 암모니아 생성을 촉진한다. 개방형 케이지에서 습도를 70%이하로 유지하기 위해서는 환기를 12~16 ac/hour로 해야 한다. 습도가 높을 경우 항온항습 시스템과 함께 제습기가 필요할 수도 있다.

■ 조도

낮 시간 동안 케이지 내부의 조명은 랫드가 혐오하는 임계값 미만의 Lux 범위에서 유지되어야 한다. 대부분의 랫드는 60 Lux 미만이고, 알미노 랫드의 경우에는 25 Lux 미만이어야 한다. 동물실에 있는 작업자가 작업을 수행할 수 있도록 하려면 작업자가 작업실에 있는 동안 조명 수준(작업 높이에서 약 210 Lux 수준)을 높여야 한다. 상단 케이지에 있는 랫드를 오버헤드 조명으로부터 보호하고 다른 선반에 있는 케이지 사이에 균일한 조명을 위해 랙 상단 선반 위의 가림막이 필요할 수 있다. 조도에 대하여 가장 잘 알려진 반응 중 하나는 빛에 노출된 설치류, 특히 랫드에서 발생하는 망막변성이다. 밝은 빛은 랫드의 망막 손상을 발생시킬 수 있기 때문에 조도를 조절하여 랫드의 눈을 보호해야 한다. Borges 등(1990)의 연구에 따르면 SD 랫드가 270 Lux(12시간 주기 명암)에 노출되었을 때 3~7일 이내에 망막이 심하게 손상되었다. 밝은 조명 시간이 길어짐에 따라 빛의 영향으로 발정주기가 불규칙해지고 번식에 영향을 미쳤다. Lambert 등(1975)은 설치류의 경우 적색광을 볼 수 없지만, 암컷 랫드에서는 적색광이 지속적으로 발정을 유발하였으며, 청색 또는 백색광은 생쥐(mouse)의 성장을 방해하였다고 하였다.

■ 소음

수많은 소음원이 있지만, 대부분의 소음은 환기 시스템에서 비롯된다. 이외에 내부의 장비 이동, 동물의 울음소리 및 활동, 사육 및 청소, 장비 작동 등

이 있으며, 동물 시설의 소음 수준은 하루에 30~102 dB 이다(Pfaff, 1974; Peterson, 1980).

동물시설의 소음과 그 원인을 고려할 때 VCSs와 함께 사용되는 환기 시스템에서 발생하는 소음을 고려해야 하는데, 급기 및 배기 송풍기는 모두 환경 소음을 생성하기 때문이다. VCSs에 의해 생성된 환경 소음 범위는 70~90 dB이었다. 발생하는 소음의 크기와 빈도는 시스템 유형과 실험실 당 장치 수에 따라 다른데, 거시 환경 소음의 범위는 74~80 dB, 미시 환경 소음의 범위는 79~89 dB이었다(Perkins and Lipman, 1996).

사람의 청력범위 및 초음파범위 내에서 소음(큰소리)은 가능한 한 줄여야 한다. 사람들이 들을 수 없는 고주파 범위의 소리로 인하여 설치류에게 스트레스를 줄 수 있는데, 랫드의 경우 청력 범위는 500 Hz~60 또는 80 kHz이므로 동물 시설의 초음파는 랫드에 영향을 줄 수 있다(Sharp and LaRegina, 1998). 고주파 초음파 신호를 방출할 수 있는 컴퓨터 또는 기타 장비는 랫드가 있는 동물실에서 사용해서는 안된다. 그러한 장비의 사용이 불가피한 경우 장비를 폴리스티렌 폼으로 포장하는 등의 조치를 하여 초음파 소음을 줄여야 한다.

랫드는 만성 소음 스트레스에 적응하기도 한다(Armario et al., 1984b, 1985). 시설에서 갑자기 발생하는 소음을 차단하기 위해 배경 음악을 백색 소음으로 활용하여 스트레스를 줄이기도 하였다(Nunez et al., 2002). 아울러, 랫드 동물실에서는 케이지의 진동은 없어야 하며, 전동 장비의 경우 높은 곳에 놓는 것은 피해야 한다.

▪ 환기

양질의 공기질을 유지하기 위해 시간당 공기 환기횟수(Air Change per Hour; ACH)를 조절해야 한다. 케이지 내의 온도 및 습도를 유지하는 수준에서 횟수를 조절할 수 있다. 동물실의 시간당 환기횟수는 15~20회가 필요할 수 있다. 개별적으로 환기되는 케이지를 수용하는 동물실의 경우 보통 시간당 5회의 환기로 충분하다.

케이지 환기율은 철망 케이지의 경우 실내 환기율의 82~92%, 신발장 형태의 사육케이지는 20~58%이다(Murakani, 1971; Clough, 1984). 뚜껑이 있는 정적 미세 격리케이지는 0.68 ac/hour의 낮은 환기율을 보였다(Keller et al., 1989). 이것은 케이지 유형 및 크기, 케이지에 수용된 동물 및 활동수준, 개체군 밀도, 깔짚 재료, 그리고 케이지 교환 빈도에 따라 결정된다.

6) 화학적 요인

실험동물은 의도적이든 의도하지 않던 공기, 물, 사료, 깔짚 및 케이지에서 발견되는 화학물질에 의해 노출될 수 있다. 환경 화학물질은 다양한 생물학적 반응에 영향을 미칠 수 있으며, 신체의 다양한 부위에 영향을 미칠 수 있다. 일반적으로 경구 또는 피부를 통해 흡수되는데, 일단 흡수되면 저장 부위, 생체 변형 부위 또는 배설 부위로 이동될 수 있다. 그것은 자체적으로 독성이 있거나 대사를 통하여 독성 생성물을 형성할 수 있다. 화학물질 노출의 영향은 독성 평가, 암 연구 또는 노화에 대한 연구와 같은 만성 연구에서 특별한 의미를 가질 수 있다. 환경 변수에는 노출환경에서 물질의 농도, 물리화학적 특성, 다른 물질과 상호작용, 노출 기간, 노출 주기, 그리고 노출 경로 등이 포함된다.

▪ 가스상 오염물질

과거에는 아세톤, 에테르, 클로로포름과 같은 휘발성 유기용제가 동물시설에서 일반적으로 사용되었으나, 실험동물에게 영향을 끼칠 수 있기 때문에 현재는 사용을 하지 않는다. 아울러, 일상적인 사육에서 살충제 및 악취 방지제와 같은 물질을 사용하는 것은 좋지 않다. 가능하면 비휘발성 화학물질을 사용해야 한다(Newberne and Fox, 1978).

동물 배설물에서 발생하는 주요 가스상 오염물질은 이산화탄소와 암모니아이다. 철망 덮개를 가진 사육상자 케이지에서 이산화탄소는 실내 공기보다 3배 더 높은 수준에 도달할 수 있다. 사육상자에서 암모니아는 1~2일 안에 감지

될 수 있고, 7일째에는 700 ppm을 초과하는 수준에 도달할 수 있다(Flynn, 1968; Gamble and Clough, 1976; Hasenau et al., 1993).

▪ 살충제

살충제에 노출되면 효소가 유도되거나 억제되고 다른 화합물의 독성이 증가하거나 감소할 수 있다. 또한, 내분비 기관의 기능과 체내의 신진대사가 변경될 수 있다. 일반적으로 살충제 사용으로 원치 않는 합병증의 위험이 높아질 수 있기 때문에 동물시설에서는 비화학적 해충 구제 수단을 최대한 활용하는 것이 좋다. 살충제는 절대적으로 필요한 경우에만 사용되어야 하며, 최대한의 재량과 통제 하에 소량만 사용해야 한다. 비휘발성 형태의 살충제를 사용하고 동물 사육실 이외의 구역은 제한하는 것이 바람직하다.

살충제를 사용해야 하는 경우 피레스로이드(pyrethroids)가 상대적으로 독성이 없기 때문에 사용된다. 그러나, 적어도 하나의 피레스로이드 살충제는 면역조절성이기 때문에 사용시 시험 관련자들에게 알려야 하며 승인된 화합물만 사용해야 한다(Punareewattana et al., 2001; Prater et al., 2002).

▪ 약물

약물은 질병, 마취 또는 안락사 등 치료 또는 통제를 위하여 사용될 수 있다. 다양한 약물과 마취제가 HMEs(간 미세소체 효소)와 간 기능에 영향을 미칠 수 있다. 따라서 일반적으로 시험책임자의 인지와 동의 없이 동물에 대하여 약물 치료를 하면 안된다.

▪ 세제, 탈취제 및 화학 살균제

비누, 세제, 습윤제, 소독제, 용제를 비롯한 다양한 화합물이 동물 시설의 내부 벽과 장비를 청소하고 소독하는데 사용된다. 대부분의 세척 화합물에는 향기로운 냄새와 HME 활성화에 영향을 주는 휘발성 물질이 포함되어 있다(Conney and Burns, 1972; Lang and Vesell, 1976). 탈취제 또는 악취제

거제를 사용하면 열악한 환경을 숨길 수 있으나, HME 활동을 유발할 수 있으므로 동물 시설에서 사용해서는 안된다.

모든 청소 및 위생을 충족할 수 있는 하나의 작용제(agent)를 선택하는 것은 불가능하지만, 시설에서 사용되는 다양한 작용제 수를 가능한 한 최소화하는 것이 현명하다. 염소를 기반으로 하고 있는 할로겐 화합물은 대부분의 바이러스에 효과적이지만 유기물이 존재하면 빠르게 비활성화 된다. 따라서, 적절하게 사용하면 동물에 노출되거나 독성이 발생할 가능성이 상대적으로 적다. 최근에 사용되는 세제의 대부분은 안전 범위가 넓으며 인간이나 동물의 안전에 위협이 되지 않는다. 이러한 세제들은 돌연변이 시험과 생식시험에서 음성이었으며, 기형발생 연구에서도 모체 독성을 일으키지 않았다(Burek and Schwetz, 1980; Robinson and Nair, 1992; Robinson and Schroeder, 1992).

이산화염소(ClO_2)는 염소 및 클로라민보다 강력한 소독제이다. 오존은 항균 효과에 있어서 더 좋지만 잔류 소독 능력이 떨어진다. ClO_2 는 또한 랫드의 새끼 생존력 또는 체중에 영향을 미치지 않고, 태아 발달에도 영향을 미치거나 랫드와 마우스에서 기형을 유발하지 않는다(Gerges et al., 1985; Skowronski et al., 1985).

모든 화학물질은 사용을 최소화하고, 사용된 화학물질과 사용 일정을 문서화해야 한다. 고 알칼리성 세제로 플라스틱 케이지를 세척할 경우 플라스틱이 분해되는 경우가 발생한다. 손상된 플라스틱에서 방출된 BPA가 감수 분열의 원인이 되는데, 상온에서 폴리카보네이트와 폴리설폰으로 제작한 케이지나 물병에서 BPA가 낮은 수준으로 방출되고, 정상적인 마모조건에서 침출수준이 현저하게 증가하였다(Howdeshell et al., 2003). 또한 폴리카보네이트 병을 고압 멸균할 경우에도 BPA가 방출된다(Krishnan et al., 1993, Feldman and Krishnan, 1995).

7) 기타 요인

▪ 스트레스 및 스트레스 요인

실험동물의 환경에 있는 많은 요인들이 동물에게 스트레스를 줄 수 있다. 동물을 실험실에서 사육상자로 옮기는 간단한 작업을 최상의 조건으로 수행한다고 해도 체중감소를 초래한다. 나이가 많은 랫드와 마우스는 어린 랫드보다 운송 스트레스에 더 민감하다. 일반적으로 단기간 운송의 경우 2~4일, 장기간 운송의 경우 4~7일의 순화기간이 필요하다(Dymsza et al., 1963; Foster et al., 1967; Weisbroth et al., 1977).

스트레스 반응은 운송방식 및 기간, 동물의 나이, 주변 온도, 운송 중 음용수 제공 여부 및 기타 요인을 포함한 여러 요인에 따라 달라진다.

▪ 복지물품

랫드의 복지 환경을 위해 복지물품을 제공해야 한다. 이는 사회적 상호작용, 씹기, 갇아먹기, 이동(등반, 탐험, 놀기 포함), 쉬기, 숨기, 물품의 조작, 운반 및 비축 등의 행동을 할 수 있게 해준다.

▪ 작업자 요인 및 기타 스트레스

모든 실험동물에 있어서 사육시 피할 수 없는 부분은 사육 절차 중 동물실 작업자와 접촉하는 것이다. 케이지 교체의 일상적인 작업에도 랫드에게 일시적인 스트레스 반응을 일으킨다(Boyle and Villanueva, 1976). 랫드 행동관찰은 신체 이상 유무에 대한 모니터링 외에도 수행되어야 한다. 모니터링은 랫드가 익숙한 사람이 있을 때 수행해야 한다. 따라서, 랫드의 입장에서 랫드를 다루는 사람에게 익숙해지도록 해야 하며, 작업자는 랫드가 주변을 탐색할 수 있도록 하고 부드럽게 쓰다듬으면서 잡거나 다루어야 한다. 일상적인 사육 작업에서 랫드를 취급 할 때 랫드에게 고통을 줄 수 있는 절차 등이 있어서는 안되며, 랫드를 항상 조용하고 부드럽게 다루도록 해야 한다.

동물 작업자가 꼬리로 랫드를 들어 올리는 경우 특정 중추 신경계 약물로 치

료한 랫드에서 경련을 유발하였다. 이와 반대로 랫드를 부드럽게 다루고 꼬리로 들어 올리는 것을 피할 경우에는 경련 빈도가 감소하였다(Goldstein, 1973).

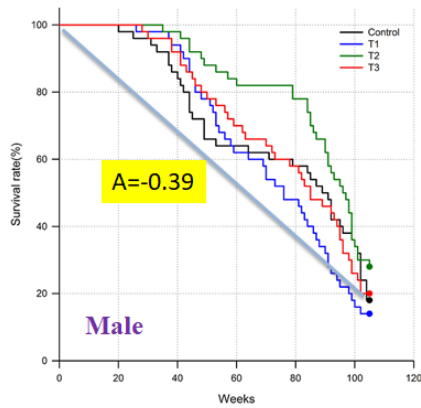
2. 생존율 비교

아래의 [그림 III-1]은 지금까지 수행하였거나 수행중인 발암성시험에 대한 랫드의 생존율을 나타내었으며, 발암성시험에 대한 랫드의 생존율을 3가지 시험물질별, 암·수 성별별로 비교하였다.

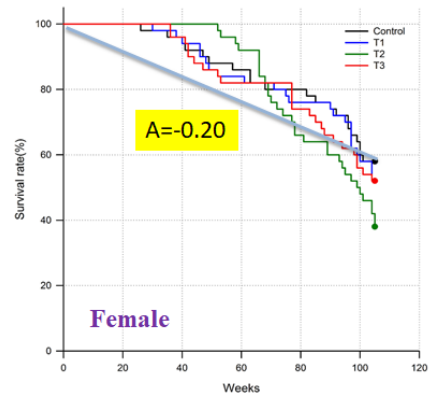
[그림 III-1]의 (a)와 (b)는 시험물질 A에 대한 수컷과 암컷의 생존율 결과이다. 시험 종료시 수컷 대조군의 생존율은 18%, T1군은 14%, T2군은 28%, T3군은 20%였으며, 암컷 대조군의 생존율은 58%, T1군은 52%, T2군은 38%, T3군은 52% 이었다. Log Rank Test(Peto 등, 1977)에 의한 생존율 유의성은 인정되지 않았다. 또한, 생존율 기울기(A =사망개체/노출기간)는 수컷 $A=-0.39$, 암컷 $A=-0.20$ 이었다.

(c)와 (d)는 시험물질 B에 대한 수컷과 암컷의 생존율 결과이다. 시험 종료시 수컷 대조군의 생존율은 27%, T1군은 27%, T2군은 25%, T3군은 42%였으며, 암컷 대조군의 생존율은 65%, T1군은 60%, T2군은 58%, T3군은 58% 이었다. Log Rank Test에 의한 생존율 유의성은 인정되지 않았다. 또한, 생존율 기울기는 수컷의 경우 첫 노출부터 69주까지 $a'=-0.21$, 70주부터 노출 종료일까지 $a''=-0.61$, 노출기간 전체 $A=-0.35$ 이었으며, 암컷의 경우 첫 노출부터 69주까지 $a'=-0.13$, 70주부터 노출 종료일까지 $a''=-0.21$, 노출기간 전체는 $A=-0.16$ 이었다.

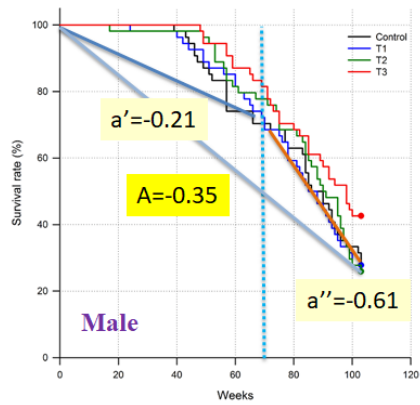
(e)와 (f)는 시험물질 C에 대한 100주 기준의 수컷과 암컷의 생존율 결과이다. 수컷 대조군의 생존율은 58%, T1군은 37%, T2군은 52%, T3군은 50%였으며, 암컷 대조군의 생존율은 73%, T1군은 78%, T2군은 65%, T3군은 80% 이었다. Log Rank Test에서 수컷의 경우 생존율 유의성은 인정되지 않았으며, 암컷의 경우 T3군에서 생존율 유의성($p<0.05$)을 보였다. 또한, 생존율 기울기는 수컷 $A=-0.21$, 암컷 $A=-0.13$ 이었다.



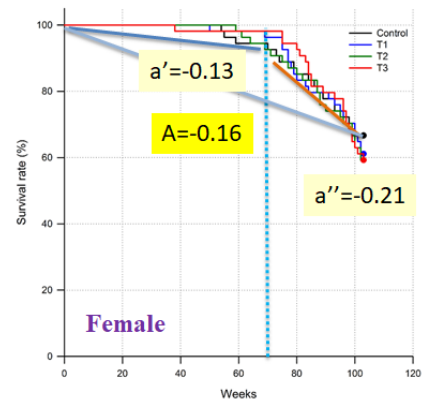
(a)



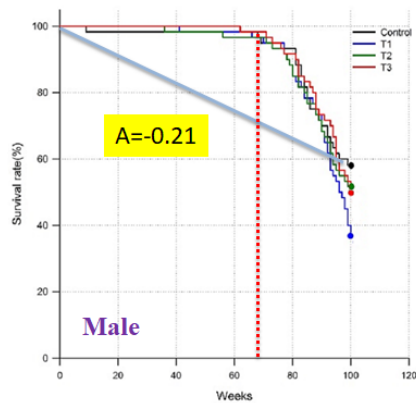
(b)



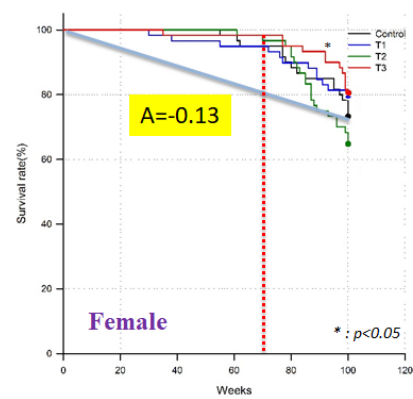
(c)



(d)



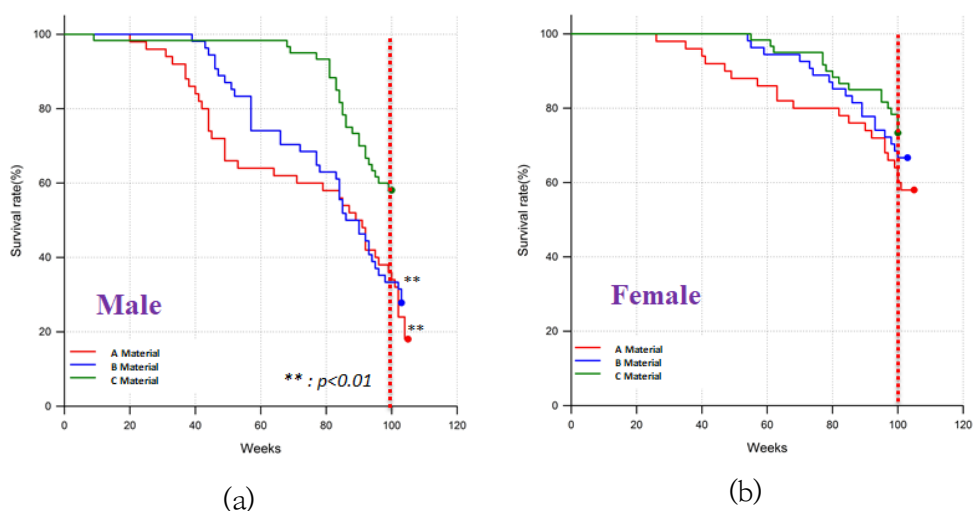
(e)



(f)

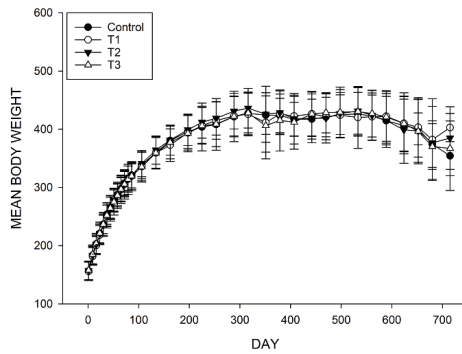
[그림 III-1] 발암성시험별 랫드의 생존율

[그림 III-2]는 시험별 대조군의 수컷과 암컷 생존율만 나타낸 것이다. 연차적으로 A, B, C물질 발암성시험이 진행될수록 암·수 모두 생존율이 증가하였다. 100주를 기준으로 수컷 A, B, C물질의 생존율은 각각 34%, 33%, 58%이었으며, 암컷 생존율은 각각 60%, 65%, 73% 이었다. Log Rank Test에서 생존율은 C물질과 비교하여 A물질과 B물질은 의 유의성($p < 0.01$)을 보였다.

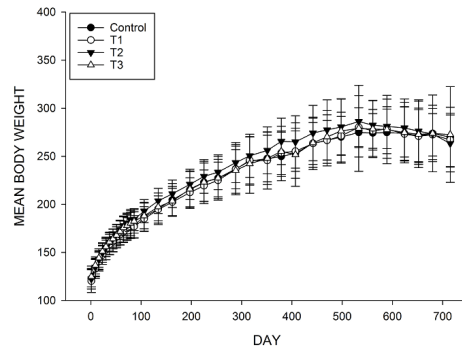


[그림 III-2] 발암성시험별 대조군의 생존율 비교

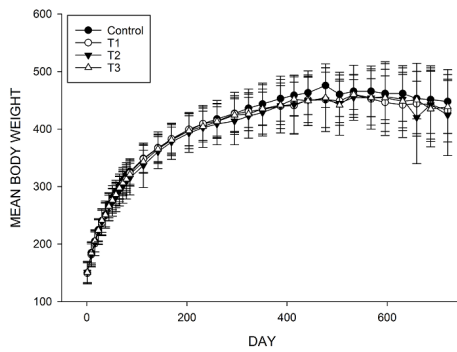
[그림 III-3]은 각 시험별 체중변화를 나타낸 것이다. (a)와 (b)는 시험물질 A에 대한 수컷과 암컷의 체중변화이다. 암·수 모두 체중변화의 유의성은 보이지 않았다. (c)와 (d) 시험물질 B에 대한 수컷과 암컷의 체중변화에서도 유의성은 보이지 않았다. (e)와 (f) 시험물질 C에 대한 수컷과 암컷의 체중변화에서 수컷은 대조군과 비교하여 T2군, T3군이 대조군과 비교하여 유의성($p < 0.05$, $p < 0.01$)이 전반적으로 보였고, 암컷의 경우는 T1, T2, T3군이 대조군과 비교하여 유의성($p < 0.05 \sim p < 0.001$)이 전반적으로 보였다.



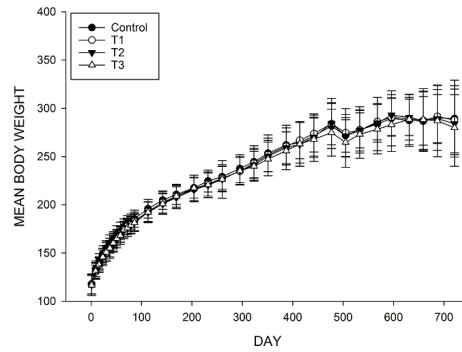
(a)



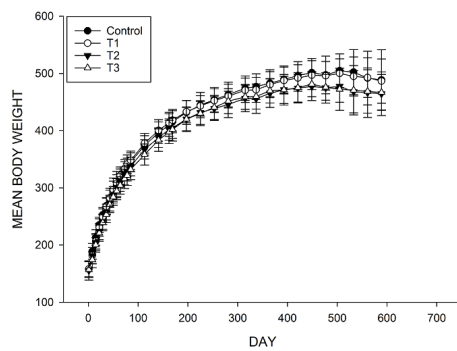
(b)



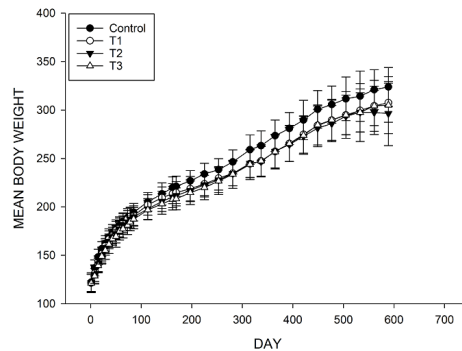
(c)



(d)



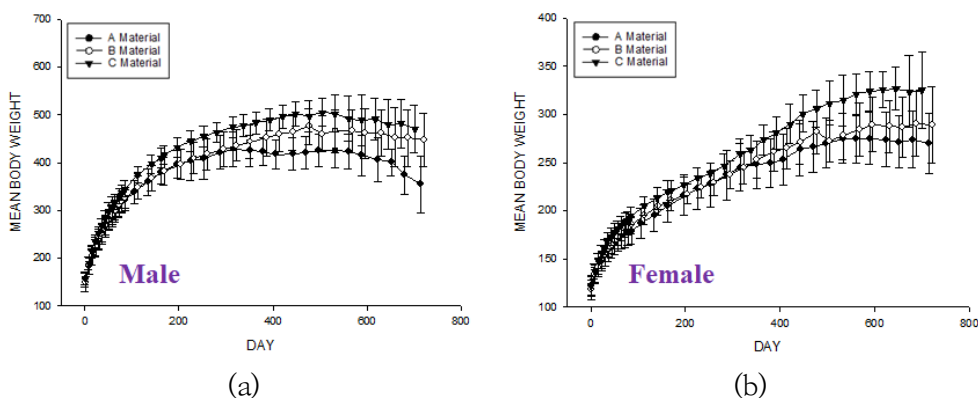
(e)



(f)

[그림 III-3] 발암성시험별 랫드의 체중변화

[그림 III-4]는 시험별 대조군 수컷과 암컷의 체중변화를 나타낸 것이다. 100주를 기준으로 암·수 모두 C물질의 발암성시험에서 체중 증가량이 가장 높았으며, B물질, A물질 순서로 체중이 적게 증가하였다. 다만, 수컷은 전반적으로 400~500일 전후로 체중이 감소하는 양상을 보였으며, 암컷은 초반에는 체중이 급격하게 증가하다가 점차적으로 완만하게 증가하거나 현재 체중을 유지하였다.



[그림 III-4] 발암성시험별 대조군의 체중변화 비교

3. 환경조건 측정

발암성시험 구역에 대하여 측정한 환경조건을 측정한 결과는 아래와 같다.

1) 가스상 물질

▪ 동물실

〈표 III-1〉은 동물실 사육상자 내의 가스상 물질의 농도를 측정한 결과이다. 산소농도는 깔짚 및 음용수병을 포함한 사육상자를 교체한 첫날(0일차)부터 교체 마지막 날(7일차)까지 대조군과 노출군 모두 19% 이상이였다. 이산화탄소

농도는 사육상자를 교체한 첫날(0일차)부터 교체 마지막 날(7일차)까지 대조군 0.05~0.14%(500~1,400 ppm), 노출군 0.05~0.12%(500~1,200 ppm)로 모두 기준치 5,000 ppm 미만이었다. 암모니아는 사육상자를 교체한 첫날(0일차)부터 교체 마지막 날(7일차)까지 대조군과 노출군 모두 0 ppm으로 검출되지 않았다. 황화수소는 사육상자를 교체한 첫날(0일차)부터 교체 마지막 날(7일차)까지 대조군과 노출군 모두 0 ppm으로 검출되지 않았다.

〈표 Ⅲ-1〉 동물실 사육상자 내의 가스상 물질 농도

Day Classification		0	1	3	5	7
O ₂ (%)	Control group	19.44±0.06	19.86±0.06	20.12±0.19	19.54±0.06	19.68±0.11
	Exposed group	19.93±0.07	20.39±0.12	20.52±0.19	19.91±0.05	19.82±0.09
CO ₂ (%)	Control group	0.10±0.02	0.14±0.03	0.05±0.00	0.10±0.03	0.12±0.02
	Exposed group	0.06±0.01	0.11±0.02	0.05±0.00	0.09±0.02	0.12±0.01
NH ₃ (ppm)	Control group	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	Exposed group	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
H ₂ S (ppm)	Control group	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	Exposed group	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

Value : Mean±Standard deviation

■ 흡입챔버

〈표 Ⅲ-2〉는 흡입챔버 내의 가스상 물질의 농도를 측정한 결과이다. 산소 농도는 흡입챔버 내부를 청소한 첫날(0일차)부터 교체 마지막 날(7일차)까지 대조군과 노출군 모두 19% 이상이였다. 이산화탄소농도는 흡입챔버 내부를

청소한 첫날(0일차)부터 교체 마지막 날(7일차)까지 대조군과 노출군 모두 0.02~0.03%(200~300 ppm)로 모두 기준치 5,000 ppm 미만이었다. 암모니아는 흡입챔버 내부를 청소한 첫날(0일차)부터 교체 마지막 날(7일차)까지 대조군과 노출군 모두 0 ppm으로 검출되지 않았다. 황화수소는 흡입챔버 내부를 청소한 첫날(0일차)부터 교체 마지막 날(7일차)까지 대조군과 노출군 모두 0 ppm으로 검출되지 않았다.

〈표 III-2〉 흡입챔버 내의 가스상 물질 농도

Day Classification		0	1	3	5	7
O ₂ (%)	Control group	19.78±0.08	19.79±0.10	19.53±0.14	19.60±0.05	19.68±0.18
	Exposed group	19.91±0.07	19.76±0.07	19.68±0.05	19.93±0.05	19.63±0.08
CO ₂ (%)	Control group	0.02±0.00	0.03±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.03±0.00
	Exposed group	0.03±0.10	0.03±0.00	0.02±0.00	0.02±0.01	0.03±0.00
NH ₃ (ppm)	Control group	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	Exposed group	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
H ₂ S (ppm)	Control group	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	Exposed group	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

Value : Mean±Standard deviation

2) 소음

〈표 III-3〉은 동물실과 흡입챔버실의 소음을 측정한 결과이다. 동물실 소음은 대조군 동물실의 경우 49.37 dB, 노출군 동물실의 경우 49.67 dB 이었으

며, 흡입챔버실 소음은 대조군 흡입챔버실의 경우 56.33 dB, 노출군 흡입챔버실의 경우 57.77 dB이었다. 그리고, 흡입챔버 문을 닫을 때의 충격소음은 대조군 흡입챔버 82.73 dB, 노출군 흡입챔버 82.07 dB이었다.

〈표 III-3〉 동물실과 흡입챔버실의 소음

Classification		value
Animal room	Control group	49.37±1.22
	Exposed group	49.67±1.11
Chamber room	Control group	56.33±0.38
	Exposed group	57.77±0.15
Control group chamber	Door Shock noise	82.73±0.60
Exposed group chamber	Door Shock noise	82.07±0.91

Value : Mean±Standard deviation

3) 조도

〈표 III-4〉는 동물실과 흡입챔버실의 조도를 측정한 결과이다. 동물실의 조도는 대조군 동물실 중앙의 경우 281.31 Lux, 사육상자 랙에서 사육상자를 장착하는 최상단인 5단 위치에서는 32.56 Lux, 사육상자를 장착하는 최하단인 1단 위치에서는 17.01 Lux이었다. 흡입챔버실 중앙의 경우 대조군 흡입챔버실 중앙은 230.85 Lux, 노출군 흡입챔버실 중앙은 275.15 Lux이었다.

동물을 수용하여 흡입실험을 하는 흡입챔버의 경우 대조군 챔버의 최상단 사육케이지 위치에서는 140.51 Lux, 대조군 챔버의 최하단 사육케이지 위치에서는 114.69 Lux이었으며, 노출군 흡입챔버의 최상단 사육케이지 위치에서는 104.43 Lux, 노출군 흡입챔버의 최하단 사육케이지 위치에서는 71.57 Lux이었다.

〈표 Ⅲ-4〉 동물실과 흡입챔버실의 온도

Classification		value
Animal room	Center	281.31±1.34
	Cage rack top	32.56±6.16
	Cage rack bottom	17.01±7.38
Chamber room	Control group room center	230.85±2.54
	Exposed group room center	275.15±0.51
Control group chamber	Chamber top	140.51±0.51
	Chamber bottom	114.69±3.56
Exposed group chamber	Chamber top	104.43±3.56
	Chamber bottom	71.57±0.51

Value : Mean±Standard deviation

4) 온도, 상대습도, 환기

〈표 Ⅲ-5〉는 시험기간 중에 동물실과 흡입챔버실, 흡입챔버 내의 온도, 상대습도, 그리고 시간당 환기횟수(ACH)를 측정한 결과이다. 대조군 동물실은 온도 23.0℃, 상대습도 45.2%, 흡입챔버실은 온도 23.7℃, 상대습도 46.9%이었으며, 노출군 동물실은 온도 23.7℃, 상대습도 43.9%, 흡입챔버실은 온도 22.7℃, 상대습도 46.4%이었고, 동물실과 흡입챔버실의 시간당 환기횟수는 13.97~15.10회 이었다. 또한, 흡입독성시험을 수행하는 대조군 흡입챔버 내부의 경우 온도 22.6℃, 상대습도 45.6%이었으며, 노출군 흡입챔버 내부의 온도는 22.6℃, 상대습도 47.5%이었고, 흡입챔버 내부의 시간당 환기횟수는 모두 11.9회 이었다.

〈표 III-5〉 동물실과 흡입챔버실의 온도·상대습도·환기

Classification \ Items		Temperature (°C)	Relative Humidity (%)	ACH (#/hour)
Control group	Animal room	23.0±0.11	45.2±0.51	13.97~15.10*
	Chamber room	23.7±0.23	46.9±1.79	
Exposed group	Animal room	23.7±0.23	43.9±0.63	
	Chamber room	22.7±0.19	46.4±3.26	
Control group chamber		22.6±0.38	45.6±1.62	11.9±0.10
Exposed group chamber		22.6±0.56	47.5±0.99	11.9±0.06

* : Integrated management of ventilation in chronic zone

Value : Mean±Standard deviation

4. 사육환경

1) 사육시설

흡입독성연구센터는 동물시설과 사무실이 다른 층으로 분리되어 있으며, 특히 동물의 경우는 격리된 청정구역 내에 설치되어 있다. 외부에서 청정실로 입실하기 위해서는 탈의 및 갱의를 하고, 소독제로 소독 후 에어샤워를 한 다음 청정실로 입실하게 되어 있다. 청정구역과 오염구역간의 교차오염의 방지를 위하여 청정복도와 동물실 사이에 전실이 있으며, 동물실에서 오염구역으로 나가기 전에 후실이 설치되어 있다. 각 동물실 안으로 출입하기 위해서 전실을 거쳐서 두 개의 문을 통과하도록 되어있다. 아울러, 첫 번째 문이 닫혀야만 두 번째 문이 열리는 'Interlock system'을 도입하여 교차오염을 최소화 할 수 있도록 되어 있다. 출입문 아랫단은 실리콘 방지막 설치로 해충의 출입을 차단할 수 있게 되어있다.

사육기자제 세척구역은 동물실과 차단된 별도의 공간에 설치되어있으며,

동물실은 전체적으로 불침투성 판넬을 사용하였다. 바닥 배수구는 비상시를 대비하여 구비되었으나, 인위적으로 동물이 탈출할 수 없도록 작업자가 장비 없이 개폐할 수 없도록 되어 있어서 랫드가 위험한 시설 노출로부터 보호되어 있다. 아울러, 동물실을 청소할 경우는 랫드를 흡입챔버 안에 넣은 후 실시하고, 흡입챔버를 청소할 경우는 반대로 랫드를 동물실의 사육상자에 수용한 후 실시하고 있다.

2) 사료, 음용수, 깔짚

사료는 감마선이 조사된 실험동물용 고형사료(Teklad Certified Irradiated Global 18% Protein Rodent Diet 2918C, ENVIGO RMS, USA)를 사용하였으며, 중금속, 곰팡이류, 유기화합물 등이 모두 기준치 미만으로 적합하였다(부록 1). 음용수는 미세여과기와 자외선 유수살균장치를 통과한 상수도수를 사용하였으며, 연 1회 이상 수질 분석 전문기관에서 검사 후 적합판정을 받았다(부록 2). 깔짚은 실험동물용 깔짚(ALBA Beta Chip DY-6606, China)을 고압멸균기로 멸균하여 사용하였으며, 중금속은 기준치 미만이거나 검출되지 않았고, 잔류농약도 검출되지 않았다(부록 3). 사료와 음용수, 그리고 깔짚에서 본 시험에 영향을 미칠만한 오염물질은 발견되지 않았다.

3) 살충제, 살균제, 세제

청정구역은 Class 10,000 수준으로 관리되고 있으며, 바닥과 벽을 주기적으로 청소하고, 청정구역에 기자재를 반입시 소독을 하게 되는데, 이 때 사용하는 살균 소독제는 파콰-A, 브롬세프, 70% 에탄올이다. 살균 소독제는 비휘발성 물질로 한 가지만 사용할 경우 내성이 생길 수 있으므로 파콰-A와 브롬세프를 일주일 간격으로 교대로 사용하였다. 주요 특징과 사용방법은 아래와 같다.

파콰-A는 바이러스, 세균, 곰팡이 제거에 사용되는 소독제로써 동물에 대한 독성이 매우 낮다. 자극성이 없고 부식성이 없으며, 효과의 지속시간이 긴 특징이 있다. 원액을 사용하는 것이 아니라, 물과 200배로 희석하여 사용하

였다. 브롬셉트는 살균력이 우수하고 자극성과 독성이 적으며, 부식성이 없고 살균 속도가 빠르다. 원액을 사용하지 않고 물과 300배로 희석하여 사용하였다. 70% 에탄올은 지용성으로 사용시 피부를 거칠게 하고 자극성도 강하기 때문에 점막이나 상처가 있는 피부에 사용하지 않았으며, 분무기에 넣어서 실험실용 wipes에 적신 후 열에 약한 플라스틱류 등 고압증기멸균기로 멸균할 수 없는 기자재에 사용하고 있다.

동물실을 청소·소독할 경우에는 실험동물에 영향을 미치지 않기 위하여 폴리설펀 사육상자에 있는 동물을 별도의 공조설비가 되어 있는 흡입챔버 내로 옮긴 후에 실시하였다. 흡입챔버 내외부를 청소·소독할 경우에는 랫드를 폴리설펀 사육상자에 넣고 동물실로 옮긴 후 실시하였다. 이 과정에서 동물에게 특별한 임상적 증상은 관찰되지 않았다.

4) 기타

■ 운송

발암성시험에 사용되는 랫드의 경우 항공과 육상으로 장기간 이동에 따른 운송 스트레스를 받게 된다. 산업화학연구실에서는 랫드 입수시 검역과정에서 동물의 생사유무 및 임상적 영향 등을 확인하고 있으며, 검역을 마친 랫드는 7일 이상 사육환경에 적응하도록 순화시키고 있다. 이 과정에서 특별한 임상적 증상이 관찰된 랫드는 제외하고 임상적으로 정상상태의 랫드들만 실험에 활용하고 있다.

■ 복지물품

B물질 발암성시험부터 랫드에게 복지물품으로 소형 목판과 대형 목판이 제공되었다. 이러한 복지물품은 미생물이 없고 건강에 해로운 유해물질을 함유하지 않으며 먼지가 적은 것을 사용하였으며, 방사선 멸균된 용품에 대한 성적서는 공급업체로부터 받았다(부록4). 중금속이나 잔류 농약 등에 대하여는 분석을 통하여 기준치 미만이거나, 불검출인 것을 사용하고 있다.

〈표 III-6〉 발암성시험별 랫드의 치아 병변

Sex Group Classification		Male				Female			
		C	T1	T2	T3	C	T1	T2	T3
A material*	Broken incisor	4	2	0	3	1	0	2	1
	Increased length	0	0	0	0	0	0	2	0
	Loss of incisor	0	0	0	0	0	0	1	0
B material*	Increased length	0	2	2	1	1	0	0	0
	Loss of incisor	0	1	1	0	0	0	0	0
C material**	Increased length	0	1	0	0	0	0	0	0
	Loss of incisor	0	0	0	0	0	0	0	0

* : Gross findings, ** : Clinical signs

철망케이지 내에 복지물품인 대형 목판이 제공된 B물질의 발암성시험부터 랫드의 앞가락 절단 상해가 줄어들었으며, 철망케이지에 앞니가 끼여 깨지는 사고도 발생하지 않았다. 〈표 III-6〉는 발암성시험별 랫드의 앞니가 깨진 경우, 길게 자란 경우, 그리고 앞니가 손실된 경우를 나타내었다. 철망케이지 안에 목판을 제공하지 않은 A물질 발암성시험의 경우 앞니가 깨진 사례가 수컷 대조군 4례, T1군은 2례, T3군은 3례가 있었으며, 암컷 대조군 1례, T2군 2례, T3군 1례가 있었다. 앞니가 길게 자란 사례는 암컷 T2군 2례, 앞니가 손실된 사례는 암컷 T2군 1례가 있었다. 철망케이지 안에 대형 목판을 제공한 B물질 발암성시험의 경우 앞니가 깨진 사례는 없었다. 앞니가 길게 자란 사례는 수컷 T1군 2례, T2군 2례, T3군 1례가 있었으며, 암컷의 경우 대조군 1례가 있었고, 앞니가 손실된 사례는 T1군 1례, T2군 1례가 있었다. 철망케이지 안에 대형 목판을 제공하고 사육상자에서 사육한 C물질 발암성시험의 경

우 앞니가 길게 자란 사례는 수컷 T1군 1례가 있었으며, 암·수 모두에서 앞니가 손실된 사례는 없었다.

■ 작업방법

작업자는 랫드를 동물실에서 흡입챔버실로, 흡입챔버실에서 동물실로 옮기는 작업을 주기적으로 수행하고 있다. 동물실 작업자는 랫드 취급시 랫드 꼬리를 잡고 이동시키는 경우가 많았으며, 철망케이지를 넣거나 빼는 작업을 할 때 흡입챔버 내에 철망케이지를 지지하는 스테인리스 배변 판이나 지지대로 인하여 랫드 발가락이 상해를 당하는 사례도 종종 발생하였다.

IV. 고찰

.....

IV. 고찰

■ 생존율

연차적으로 수행하고 있는 A, B, C 물질의 발암성시험 3건에 대한 대조군 랫드의 생존율을 Kaplan-Meier의 방법으로 분석한 결과, 연차가 진행될수록 생존율이 증가하는 경향을 나타내었다. 노출군은 시험물질의 영향이 반영될 수 있기 때문에 [그림 III-2]와 같이 각 시험에서 대조군들만 비교하였으며, C물질의 발암성 시험은 현재 진행 중임을 고려하여 모든 시험을 2021년 10월말인 100주차를 기준으로 비교하였다. 대조군 수컷 랫드의 생존율은 A물질 34%, B물질 33%, 그리고 C물질 58%이었으며, 대조군 암컷 랫드의 생존율은 A물질 60%, B물질 65%, 그리고 C물질 73%을 보여 발암성시험의 연차가 진행될수록 생존율이 향상되었다. [그림 III-1]의 수컷 랫드의 생존율 기울기를 보면, A물질은 수컷 -0.39, 암컷 -0.20으로 가장 기울기가 컸으며, B물질은 수컷 -0.35, 암컷 -0.16, 그리고 C물질은 수컷 -0.21, 암컷 -0.13으로 연차가 진행될수록 생존율 기울기가 완만하였다. A물질 발암성시험은 흡입챔버 내 철망케이지에서 노출과 사육을 하였으며, B물질 발암성시험은 노출 시작일 부터 69주까지는 흡입챔버 내 철망케이지($a' = -0.21$)에서 사육하였고 70주부터 노출 종료일까지 동물실 사육상자($a'' = -0.61$)에서 사육하였다. 사육상자로 옮겨 사육한 70주부터 노출 종료일까지의 기울기가 더 큰 이유는 다른 발암성시험과 마찬가지로 후반기로 갈수록 랫드가 노령화되어 사망한 개체가 증가함으로써 생존율이 급감한 것으로 보인다. C물질 발암성시험은 노출시간을 제외한 사육기간동안 동물실 사육상자에서 사육하였다. A물질, B물질, C물질의 발암성시험으로 연차가 진행될수록 생존율 기울기가 완만하여 생존율이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, Log Rank Test에서 암컷의 T3군은 다른 군과 비교하여 유의성($p < 0.05$) 있게 높은 생존율을 보였으나, 생존율과 체중의 연관성은 없었다. C물질 발암성시험은 2021년 10월말

기준으로 시험물질 노출이 진행 중이며, 시험 내의 결과이기 때문에 추후에 다각적인 검토가 필요하다고 판단된다. [그림 III-2]의 발암성시험별 생존율에서 암컷 유의성을 보이지 않았고, 수컷의 경우 C물질 발암성시험과 비교하여 A물질과 B물질의 발암성시험이 유의하게($P < 0.01$) 낮은 생존율을 보였다. 사육기간 동안 동물실 사육 상자에서 사육한 경우와 흡입챔버 내 철망케이지에 대형 목판을 제공한 경우에서 높은 생존율을 보였다.

Rao 등(1990)은 F344 랫드를 이용하여 1971년부터 1981년까지의 11년간 독성시험에서 식단 대조군을 포함하여 수컷 5,184마리와 암컷 5,289마리에 대하여 성장, 체중, 생존 및 종양 유병율에 대한 평가를 하였다. 평균적으로 수컷의 생존율은 74.0%, 암컷의 생존율은 79.8%로 암컷의 생존율이 더 높았다. 투여경로와 관련된 실험변수로 인하여 위관투여법, 피하투여법, 흡입법에 의한 것은 배제되었다. 따라서, 우리 연구원에서 수행하는 흡입시험과 직접적으로 비교하기에는 한계가 있기 때문에, 생존율 경향만 참고하였다. 여기서 수컷의 생존율이 시간에 따라 현저하게 감소하는 경향을 보였는데, 이는 체중 증가, 백혈병 유병율, 병든 동물의 안락사 및 관련 질병에 기인하였다고 하였다. 또한, 백혈병 유병율과 체중증가는 직접적으로 연관성은 없었으나, 백혈병 유병율은 생존율과 반비례함으로써 치명적인 질병이라고 하였다.

〈표 IV-1〉에서 발암성시험은 1972년, 1978년, 그리고 1981년도에 수행한 연구이었으며, 수컷의 생존율은 각각 76.7%, 75.0%, 62.5%, 암컷의 생존율은 각각 77.9%, 78.8%, 70.8%로 연차별로 다소 차이가 있으나 수컷 랫드의 생존율이 연차별로 진행됨에 따라 유의하게 감소하였다. 원인은 체중 증가 및 백혈병 유병율 증가 외에 NTP에서 1982년도에 연구 종료 3개월 내의 빈사 상태 동물을 인도적으로 처리하도록 권고하였기 때문이었다. 이러한 이유로 생존율은 줄었으나, 조직병리학적으로 좋은 조직을 확보할 수 있었다고 하였다. 이외에 Kerns 등(1983)은 발암성연구에서 흡입노출시간을 제외하고 다른 수용공간에서 랫드를 사육하였으며, 수컷 랫드의 생존율은 약 92%, 암컷 랫드는 약 88%이었다. Matsumoto 등(2020)은 발암성연구시 흡입챔버 내의

철망케이지에서 개별 사육하였으며, 수컷 랫드 76%, 암컷 랫드 80%의 생존율을 보였다. 즉, 철망케이지보다는 사육상자 등 별도의 수용공간에서 사육할 경우 생존율이 높았음을 알 수 있다.

〈표 IV-1〉 암·수 랫드의 생존율

Year ^a	Survival (%)	
	Male	Female
1971	85.3 ^b (17.5) ^c	83.3 (12.6)
1972	76.7 (15.8)	77.9 (15.5)
1973	81.6 (10.9)	82.3 (13.4)
1974	77.0 (7.8)	83.3 (7.7)
1975	65.5 (10.9)	81.0 (8.7)
1976	74.1 (9.4)	81.8 (6.4)
1977	74.5 (7.5)	78.7 (6.8)
1978	75.0 (6.6)	78.8 (5.9)
1979	75.7 (7.4)	84.4 (5.7)
1980	66.4 (7.5)	75.0 (8.9)
1981	62.5 (8.5)	70.8 (7.8)
11-yr average	74.0	79.8
Significance of time trend	$p < 0.001$	$p = 0.082$

^a Year of study start.

^b Mean.

^c Standard deviation.

[출처] Rao et al., 1990.(Table II. Survival to 106 weeks of age for male and female F344/N rats.)

체중과 생존율의 연관성은 [그림 III-4]에서 확인할 수 없었다. C물질의 발암성시험에서 암·수 랫드의 체중이 A물질과 B물질의 발암성시험보다 높았음에도 불구하고 C물질의 발암성시험에서 생존율이 더 높은 결과를 보였다. Rao 등(1990)은 발암성연구(시작연도 1971년, 1978년, 1981년)에서 수컷 평균 체중이 408 g에서 480 g으로 증가함에 따라 생존율은 74.0%에서 62.5%로

감소하였고, 암컷 평균 체중이 307 g에서 349 g으로 증가함에 따라 생존율이 79.8%에서 70.8%로 줄었다고 한 것과는 대조적으로, 본 연구에서는 반대로 체중이 증가했음에도 불구하고 생존율이 더 높았다. 이러한 이유는 A, B, C물질의 발암성시험이 서로 다른 사육조건이었기 때문으로 사료된다. 랫드의 시험물질 노출시간을 제외한 사육기간 동안 사육상자에 사육한 암·수 랫드의 체중이 가장 높았고, 노출시간과 사육기간을 포함한 전 생애를 철망케이지에서 사육한 동물의 체중이 더 낮았다. 사육상자에서 사육한 경우 깔짚과 소형 목판을 제공하여 랫드가 숨기, 쉬기, 사회적 상호작용, 씹기 등을 할 수 있었으며, 심리적으로 안정을 취할 수 있었기 때문으로 판단된다. 아울러, A물질과 B물질의 발암성시험의 노출군 생존율이 대조군보다 더 높았는데, 과거자료(historical data)가 축적되어 있지 않기 때문에 어떠한 이유인지는 알수는 없었다. 경험적으로 유추해 봤을 때 일반적으로 복합적 환경 요인에 의한 개체특이성인 경우가 많았고, 시험물질 노출에 대한 저항으로 생존력이 더 높아진 것은 아닌가 추측된다. 이에 대한 연구는 더 필요할 것으로 사료된다.

■ 가스상 물질(산소, 이산화탄소, 암모니아, 황화수소)

흡입챔버 내의 가스상 물질의 농도를 측정한 결과, 랫드에게 영향을 미칠만한 요인은 없었다. 흡입챔버 내부를 청소한 첫날과 일주일 후 청소하기 직전에 측정한 산소 농도는 모두 18%이상으로 적정 수준을 유지하였으며, 이산화탄소 농도는 허용기준치 미만이었고, 암모니아, 그리고 황화수소 농도는 검출되지 않았다. 각각의 기준치로 볼 때 이산화탄소 농도는 기준치 5,000 ppm의 4~6% 수준이었고, 암모니아와 황화수소 가스 농도의 경우는 청소하기 직전까지 측정한 값이 0 ppm으로 검출되지 않았다. 사육상자의 경우, 산소 농도는 19% 이상으로 적정 수준을 유지하였으며, 이산화탄소 농도는 기준치의 10~14% 수준이었고, 암모니아와 황화수소 가스 농도는 검출되지 않았다. 따라서, 가스상 물질에 의한 동물에 영향은 없는 것으로 판단되었다. 이러한 가스상 물질이 기준치보다 훨씬 낮은 결과를 보임으로써 흡입챔버 및 동물실의

시간당 환기 횟수를 줄이거나 청소주기를 늘리는 방법으로 시설을 효율적으로 운용할 수 있다. Robert 등(2006)은 사육상자 안의 깔짚교체는 일반적으로 케이지 내의 암모니아농도 20 ppm, 이산화탄소농도 5,000 ppm을 기준으로 1주에 1회를 권장하고 있으며, 사용되는 깔짚의 종류와 공기질에 따라 교체관리가 필요하다고 하였다. 케이지 교체주기를 1주에 1회 또는 2주에 1회, 경우에 따라 교체기간을 더 길게하여 교체빈도를 줄일 수 있으며, 케이지 교체 사이의 기간을 늘리면 동물실 및 케이지 세척의 인건비, 깔짚 사용량 등이 절감되어 사육 절차 및 케이지 위생과 관련된 화학물질 사용도 절감할 수 있다고 하였다. 깔짚 교체 후 7일째에 암모니아 농도가 700 ppm을 초과하는 수준에 도달할 수 있다(Flynn, 1968; Gamble and Clough, 1976; Hasenau et al., 1993)는 연구들과 비교하여 흡입독성연구센터 청정실에서 암모니아농도가 높지 않았다. 암모니아는 요소분해 세균에 의하여 분뇨 중의 요소가 분해되어야 생성되는데, 청정실의 경우 이러한 요소분해 세균이 많지 않고(농림축산검역본부, 2020), 시간당 환기 횟수도 적정하기 때문으로 풀이된다. 따라서, 공기질과 관련 있는 시간당 환기를 현재 상태로 유지할 경우, 흡입챔버실 내 청소·소독과 사육상자 교체 주기를 현행 1주에 1회에서 2주에 1회로 교체빈도를 줄일 수 있고 노동력 절감과 경제적인 이익도 추구할 수 있다고 판단된다.

■ 조도

빛에 의하여 가장 잘 알려진 반응 중 하나는 빛에 노출된 설치류, 특히 랫드에서 발생하는 망막변성이다. 작업자가 작업을 하기 위한 조도는 최소 210 Lux가 필요하다(Castelharno-Carlos, 2009). OECD TG(2018)에서는 동물실 조도의 경우 150~300 Lux를 기준으로 하고 있다. 흡입독성연구센터에서는 조도 기준을 준수하면서 랫드가 사육되는 공간의 경우 12시간 간격으로 조명 암/조를 하고 있으며, 조명이 켜져 있는 지정된 시간동안에만 작업을 수행하고 있다.

Weihe 등(1976)은 동물실 조도의 경우 사육랙 상단에 있는 선반의 조도가 하단의 선반보다 80배 더 높았다고 하였다. 또한, SD랫드가 270 Lux(12시간 주기 명암)에 노출되었을 때 3~7일 이내에 망막이 심하게 손상되었다고 하였다. 본 연구에서 조도를 측정한 결과, 동물실과 흡입챔버실 모두 각 실험실의 중앙에 위치한 작업대(높이 90 cm)에서 조도가 281.31 Lux로 가장 높았으며, 랫드를 수용하는 사육랙 최상단 사육상자 위치에서는 32.56 Lux, 최하단 사육상자 위치에서는 17.01 Lux로 2배정도 차이가 났으며 전체적으로 조도가 랫드의 망막에 영향을 미치지지는 않았다. 이는 조명과 가장 가까운 사육랙 최상단에는 사육상자를 두지 않고 차 상단부터 장착함으로써 최상단 선반이 가림막 역할을 하여 빛이 랫드의 망막에 영향을 주지 않았기 때문이다. 따라서, 랫드에는 빛의 영향이 없는 것으로 판단된다.

■ 소음

동물 시설에는 시설 내 환경과 관련된 소음과 의사소통 소음이 모두 존재하여 동물의 생리와 행동에 다양한 영향을 미친다. 설치류는 사람이 들을 수 없는 20 kHz 이상 주파수를 생성하고 들을 수 있으며 최대 80 kHz의 소리를 인지한다(Castelharno-Carlos, 2009). 소음에는 저주파와 고주파가 있는데, 인간이 들을 수 있는 소리는 고주파에 해당한다. 인간은 20 ~ 20,000 Hz의 주파수를 인식할 수 있으며, 400 ~ 4800 Hz의 주파수는 음성영역으로 중요하다. 일반적으로 동물실의 소음은 60 dB이하를 권장하고 있다. 이러한 소음 스트레스의 해결 방법 중에 하나로, Robert 등(2006)은 음악소음(백색 소음)으로 스트레스를 감소시킬 수 있다고 하였으나, Guideline 20(2007)에서 배경 라디오 사운드의 효과는 명확하지 않기 때문에, 라디오를 사용하는 경우 큰 라디오 소리보다는 볼륨을 낮게 유지하라고 하였다.

본 연구에서 동물실의 소음과 흡입챔버실의 소음은 60 dB 미만으로 모두 기준을 충족하였고, 챔버문 개폐시 발생하는 충격소음은 82.07~82.73 dB 수준이었다. 평상시에는 실험동물에게 소음에 의한 스트레스를 주지 않지만,

실험동물을 흡입챔버 내에 넣고 빼는 작업 후 흡입챔버 문의 개폐시 발생하는 소음이 실험동물에게 스트레스를 줄 수 있다. 다만, 수시로 발생하는 소음이 아니라 하루에 2회 정도 작업시에만 발생하기 때문에 랫드에게 크게 영향을 미치지 않는다고 판단되었다. 다만, 인간은 들을 수 없으나 설치류가 들을 수 있는 영역이 저주파 영역이기 때문에 향후 이에 대한 평가도 필요할 것으로 판단된다.

▪ 온도, 상대습도, 환기

Robert 등(2006)은 랫드 사육을 위한 최적 온도는 20~26℃라고 하였다. 랫드는 10~30℃에도 적응할 수 있지만, 급격한 온도변화는 피해야 한다고 하였다. 아울러, 31℃이상의 높은 온도에 노출되면 수컷 랫드의 고환 위축 또는 사망까지 이를 수 있으며, 암컷의 경우는 수유를 못하게 된다고 하였다. 흡입독성연구센터 흡입독성 사육시설에서 동물실과 흡입챔버실, 흡입챔버 내부 온도는 22.7~23.7℃ 범위였으며, 상대습도는 43.9~47.5%, 동물실과 흡입챔버실의 시간당 환기횟수는 각각 13.97~15.10회/h, 11.9회/h로 관리되고 있었다.

사육상자 안의 동물은 물 배출로 실내보다 습도가 더 높은 경향이 있다. 습도는 동물의 체온조절 능력, 공기 중 질병의 통제 및 관리에 영향을 미치고, 케이지의 높은 습도는 암모니아생성을 촉진한다. 이에 따라 개방형 사육상자의 경우 습도를 70%이하로 유지하기 위해서 시간당 환기횟수는 12~16회가 필요하다(Robert et al., 2006). 흡입독성연구센터에서 청정실 공조시스템의 경우 급성·아만성시험 구역과 만성·발암성시험 구역으로 구분하여 관리하고 있다. 시간당 환기횟수는 동물실과 흡입챔버 내 가스상 물질의 농도와 관련 있는데, 가스상 물질 농도가 모두 기준치 미만임에 따라 시간당 환기횟수 12회는 적절하였다.

흡입독성연구센터에서 동물실과 흡입챔버실, 그리고 흡입챔버 내부의 온도와 상대습도, 그리고 시간당 환기횟수는 시험기간 동안 GLP 및 AAALAC-I

기준에 적합하게 관리 운용되고 있었으며, 이에 따른 실험동물에게 스트레스 등을 미치는 영향은 없는 것으로 판단되었다.

▪ 사육시설

사육시설은 실험동물이 사회적 상호작용과 정상적인 행동을 할 수 있어야 한다. Robert 등(2006)은 동물의 경우 휴식, 탐색, 몸단장, 먹이 찾기, 식이, 음용수, 등지 짓기, 땅 파기, 배뇨 및 배변, 사회적 행동 및 환경자극에 대한 반응과 같은 특유의 행동욕구를 충족시키기 위한 사육환경을 조성해야한다고 하였다.

흡입독성연구센터의 경우 일반 사무실 구역, 동물구역, 세척구역 등이 분리되어 있고, 물리적으로 교차오염이 최소화되도록 차압관리, interlock system 등을 도입하였으며, 각 실마다 밀폐되어 해충출입 등의 오염관리도 잘되어 있다. 아울러, 동물실 청소와 소독을 하는 경우에는 흡입챔버 안에 랫드가 격리되어 있는 상태에서 수행하고 있기 때문에 오염 구역을 통한 질병 확산의 위험을 줄임으로써 생물학적 영향은 거의 없는 것으로 판단되었다.

▪ 사육케이지

Stark(2001)에 따르면 독성학자들은 철망케이지가 깔짚이 깔린 사육상자와 비교하여 더 위생적이기 때문에 철망케이지를 선호한다고 하였다. 이러한 이유는 동물 건강평가 개선, 장비 사후관리 용이, 노동력 절약, 약물 대사에 대한 노출제어, 보다 정확한 사료 소비, 작업자의 알레르기 감소, 깔짚 섭취로 인한 실험변수 제거, 공기 순환과 암모니아 제어 향상, 임상관찰 용이, 대변 및 소변노출 감소 등의 장점을 가지고 있기 때문이다. 이와 반대로 생물학자들은 깔짚이 깔린 사육상자를 철망케이지보다 더 선호한다고 하였다. 깔짚이 깔린 사육상자를 사용하면 사지 병변의 감소, 향상된 온도 조절, 더 나은 건강평가, 더 쉬운 집단 사육, 조명 노출 감소 등의 장점을 가지고 있을뿐더러, 깔짚이 깔린 사육상자가 세계적으로 권장되기 때문이라고 하였다. 그렇지만,

발암성 흡입독성시험은 노출시간 동안에 깔짚이 깔린 사육상자에서는 실험이 불가능하고 랫드를 흡입챔버 내 철망케이지에 개별적으로 수용해야만 실험이 가능하다. 따라서 흡입독성연구센터에서는 동물 윤리위원회의 동물실험 승인을 거친 후 발암성 흡입독성시험을 포함한 모든 흡입독성연구는 철망케이지를 활용하고 있다. 철망케이지의 바닥 면적은 $2,880 \text{ cm}^2$ (W240×L1,200×H200 mm)이고, 6연식 케이지임을 감안하면 한 마리당 수용면적은 480 cm^2 (랫드 체중 300 g 기준의 바닥면적은 300 cm^2 임)이기 때문에 케이지 공간은 충분하다. 다만, 철망 바닥에 랫드가 서있다 보니 뒷발에 압력이 증가하게 되는데, 체중이 많이 나가는 수컷 랫드에서 발병변이 주로 발생하였다. Robert 등(2006)에 의하면 설치류의 철망케이지와 관련된 병리학적 병변으로 뒷발의 압력신경병증, 말초신경이상, 비노기 증후군, 결절성 팽윤 및 궤양이 있을 수 있다고 하였다. 이러한 병변 중 일부는 깔짚이 깔린 사육상자에서도 발생되기도 하지만, 1년 미만의 경우에는 발 병변이 발견되지 않았다고 하였다. 흡입독성연구센터에서 수행하고 있는 발암성시험에서 이러한 발병변을 확인할 수 있었다. 물질 A의 발암성시험은 2년간 흡입챔버 내 철망케이지에서 사육 및 노출실험을 수행하였는데, A물질의 발암성시험에서 수컷 랫드의 생존율이 낮은 것은 발병변으로 인한 면역력 약화와 합병증에 의하여 수명이 단축되었을 것으로 사료된다. 발 병변이 수컷에서 주로 발견된 점을 볼 때 체중에 의한 발 압력신경병증 가능성이 높다고 판단되었다. B물질의 발암성시험은 철망케이지 바닥에 의하여 발생하는 뒷발의 압력신경병증을 줄이고자 철망케이지 안에 대형 목판을 제공하였으며, 노출을 시작한지 70주차부터 비노출시간에는 깔짚이 깔린 폴리선폰 사육상자에 2~3마리씩 수용하였다. C물질의 발암성시험은 노출을 시작할 때부터 시험물질 노출시간을 제외한 사육기간 동안에는 깔짚이 깔린 폴리선폰 사육상자에 2~3마리씩 수용하였다. Turturro 등(1999)은 폴리선폰 사육상자 공간은 마리당 $9,875 \text{ cm}^3$ (29.2×19.0×17.8 cm)이었는데, 현재 사용하고 있는 폴리선폰 사육상자는 3마리까지 수용이 충분한 공간($31,000 \text{ cm}^3$)이다. 3가지 발암성시험에서 C물질의 발암성시험은 시작할 때부

터 흡입노출을 하는 시간을 제외하고 깔짚이 깔린 폴리설푼 케이지에서 사육하였다는 점과 흡입챔버 내의 철망케이지에는 복지물품인 대형 목판이 제공되었다는 점이 개선되었다. 결과적으로 100주차를 기준으로 수컷 생존율은 C물질의 발암성시험이 A물질 및 B물질의 발암성시험보다 약 1.7배, 암컷 생존율은 약 1.25배 증가하였다.

A물질의 발암성시험과 B물질의 발암성시험의 공통점은 노출시간과 사육시간 모두 흡입챔버 내의 철망케이지에서 랫드를 사육했다는 점이다. A물질과 B물질 발암성시험에서 수컷 랫드의 본격적으로 사망하는 시기가 모두 시험 시작 후 1년 이내였다. B물질의 발암성시험에서 사육상자로 사육장소를 변경한 시점이 70주차이므로, 시험을 시작할 때부터 제공된 대형 목판의 영향보다는 깔짚이 깔린 사육상자로 사육조건을 변경했다는 점이 생존율에 더 기여했다고 판단된다. 시험물질 노출시작부터 사육상자에 사육하였던 C물질 발암성시험에서 1년이 지난 후부터 본격적으로 사망이 시작되었다는 점이 이를 뒷받침한다.

▪ 사료, 음용수, 깔짚

사료는 감마선으로 조사하여 멸균된 실험동물용 고형사료제품을 사용하고, 음용수는 상수도를 미세여과기와 자외선 유수살균장치를 통과시켜서 미생물 오염을 제거하였으며, 흡입노출 시험을 수행하는 시간만 제외하고 사료와 음용수는 자유롭게 제공되었다. 실험동물용 깔짚은 잔류농약 및 중금속이 기준치 미만이거나 검출되지 않은 것을 사용하였으며, 청정실로 반입시 고압증기 멸균한 후 입고하여 미생물 등의 오염도 차단하였다. 시설 운용에 참고할 수 있도록 각각의 성적서는 부록에 샘플로 첨부하였다.

Rao 등(1990)은 생존율의 감소추세는 체중증가와 관련이 있고 단백질이 풍부한 식단으로 인하여 노화와 관련된 신장병의 증증도가 증가하였기 때문이라고 하였으며, Turturro 등(1999)은 칼로리를 제한한 사료 섭취를 통하여 체중을 60% 감소시켰을 경우 암·수 모두 수명이 연장되었다고 하였다. 특히

F344 수컷 랫드의 생존율이 더 높았는데, 이러한 이유는 단핵세포 백혈병의 발병을 더 많이 억제할 수 있었기 때문이라고 하였다. 흡입독성연구센터에서는 칼로리 제한 등의 특별한 조건이 아닌 일반적인 조건으로 공급하였기 때문에 사료, 음용수, 그리고 깔짚 등으로 인하여 랫드에게 생물학적 영향과 스트레스 영향은 없는 것으로 판단하였다.

▪ 살충제, 살균제, 세제

동물실 청소 및 소독은 살충제 및 살균제를 사용하였으며, 사육기자재 세척 및 소독 등은 세제를 사용하여 랫드가 입수되기 전에 실시하였으며, 입수된 후 시험기간 중에는 랫드를 격리시킨 다음에 청소 및 소독을 하였기 때문에 동물에 미치는 화학적 요인은 없는 것으로 판단되었다.

▪ 작업자

일상적으로 랫드를 취급할 때 고통을 수반하지 않도록 해야 한다. 그러나, 주기적으로 수행하고 있는 철망케이지에 랫드를 넣고 빼는 작업시, 랫드 꼬리를 잡아 랫드에게 스트레스를 야기하는 경우가 있다. 동물실 작업자는 랫드에게 스트레스를 줄일 수 있도록 부드럽게 다루어야 하지만, 동물작업에 숙련되지 못하고 랫드에 익숙하지 않기 때문에 불가피하게 스트레스가 발생하는 것이다. 작업자는 동물에 익숙해지고 부드럽게 다룰 수 있도록 숙련 교육이 필요하다고 판단되었다.

▪ 동물 복지물품

동물 복지물품으로 소형 목판과 대형 목판이 제공되었다. 소형 목판은 놀이 및 치아 다듬용 등의 씹는 장난감 용도로, 대형 목판은 씹는 장난감 용도 외에 딱딱한 철망케이지 바닥으로부터 발 보호를 위한 용도로 제공되었다.

흡입독성연구센터에서는 흡입챔버 내에 스테인리스 깔판 및 지지대를 깔고 그 위에 철망 케이지를 얹혀 놓는 방식이다. 3단으로 구성된 흡입챔버 내부에

각 단마다 설치되어 있는 스테인리스 깔판은 흡입챔버 내의 농도를 빠른 시간 내에 일정하게 도달하는 역할을 한다. 그리고 상단에 있는 랫드의 분변 및 분뇨가 하단에 있는 랫드 위치로 떨어져서 오염되는 것을 방지하는 역할도 한다. 흡입독성시험을 수행하기 위해서는 흡입챔버 내의 랫드를 넣고 빼는 작업이 필수적이다. 철망 케이지 내에 대형 목판(100×140 mm)은 랫드의 발가락 보호 역할을 하지만, 케이지 바닥(200×240mm) 전체를 덮을 수 없기 때문에 랫드의 발가락 일부가 대형 목판 옆으로 노출될 수 있다. 이 때 철망케이지 작업시 날카로운 스테인리스 깔판모서리나 지지대에 의해서 랫드의 발가락 일부가 상해를 입을 수 있다. 상해를 입은 랫드는 고통과 스트레스를 받게 되고, 스트레스를 받은 랫드는 철망 케이지를 넣고 빼는 작업시 그에 따르는 고통을 피하기 위해 도망 다니듯 케이지 내에서 회전하는 행동을 보였다. 대형 목판을 철망 케이지 내에 공급함으로써 발바닥 병변 감소와 발가락 절단 상해를 일부 줄일 수 있었다. 작업자가 철망케이지 작업 수행시 철망케이지를 옆으로 기울여서 하게 되면 상해를 더 줄일 수 있을 것이다.

랫드는 치아를 사용하여 씹지 않으면 치아는 계속 자란다. 이러한 습성 때문에 복지물품이 없는 철망케이지에서 철망을 씹으려고 하다가 앞니가 철망에 끼이는 사고가 종종 발생하였다. 철망의 그물망 크기는 8×8 mm, 10×10 mm 두 종류로 기준(11×11 mm 이하)에는 적합했으나, 주령이 낮은 어린 랫드의 경우 10×10 mm의 그물망 크기가 상대적으로 크기 때문에 앞니가 끼이는 사고가 발생하는 것으로 보인다. 일반적으로 5주령의 랫드를 입수하여 순화 기간을 거쳐 7주령부터 실험에 투입되기 때문에 작은 크기의 어린 랫드를 위하여 철망 그물망 간격이 6×6 mm의 철망케이지를 도입하는 것도 하나의 방법이라 생각된다. 앞니가 철망에 끼인 랫드를 인위적으로 철망에서 빼 낼 경우, 턱을 사용하지 못하거나 앞니가 부정교합이 되어 사료를 섭취할 수 없기 때문에 안락사처리를 해야한다. <표 III-6>에서 철망케이지 내에 대형 목판을 제공하지 않았을 경우, 대형 목판을 제공한 경우, 그리고 깔짚이 깔린 사육상자에서 사육하는 경우를 비교하면, 앞니 깨짐이나 손실 발생 빈도 차이를 확

인할 수 있다. 철망케이지 내에 대형 목판을 제공하지 않은 A물질 발암성시험에서는 앞니 깨짐이나 손실, 길게 자람은 수컷 9건, 암컷 7건이 관찰되었으며, 철망케이지 내에 대형 목판을 제공한 B물질 발암성시험에서는 앞니 손실이나 길게 자람은 수컷 7건, 암컷 1건이 관찰되었고, 철망케이지 내에 대형 목판 제공과 사육기간 동안에 사육상자에서 사육한 C물질 발암성시험에서는 수컷 1건에서만 앞니 길게 자람이 관찰되었다. 즉, 복지물품 제공으로 랫드의 씹는 습성을 충족시킴으로 앞니 깨짐이나 손실, 길게 자람이 줄어드는 효과가 있었다.

사육상자 내에도 소형 목판을 제공하여 씹기의 욕구를 충족시킬 수 있었다. 또한, 깔짚은 숨기 및 안식처로 사용될 수 있었으며, 랫드의 분노와 분변에서 발생하는 암모니아 제거 및 습도조절의 효과도 있었다. 이러한 복지물품 제공은 랫드에게 발병변 발생 감소, 발가락 절단 감소, 그리고 스트레스 감소 등의 효과를 얻을 수 있었으며, 질병 유병율 감소 효과로 랫드의 생존율을 높이는 데도 영향을 주었다고 판단되었다.

▪ 기타

Boyle과 Villanueva(1976)는 일상적인 작업인 케이지 교체로 랫드에게 일시적인 스트레스 반응을 일으킨다고 하였다. 이러한 일상적인 사육 작업에서 랫드를 취급할 때도 랫드에게 고통을 줄 수 있는 절차가 있어서는 안되며, 랫드를 항상 조용하고 부드럽게 다루어야 한다고 하였다. 또한, Goldstein(1973)은 동물 취급자가 랫드 꼬리로 들어 올리는 경우 특정 중추 신경계 약물로 치료한 랫드에서 경련을 유발하였으며, 이와 반대로 랫드를 부드럽게 다루고 꼬리로 들어 올리는 것을 피할 경우에는 경련 빈도가 감소하였다고 하였다. 이와 같이 랫드가 스트레스 반응을 유발하지 않도록 가능한 한 꼬리를 잡고 옮기는 작업방법은 피해야 한다. 아울러, 흡입챔버 내의 랫드를 넣고 빼는 작업시 랫드의 발가락 절단 상해로 고통을 주지 않도록 작업방법도 변경해야 한다.

발암성시험의 경우 2년 동안 수행하기 때문에 영구 식별이 필요하다. 흡입

독성연구센터에서는 꼬리에 문신하는 방법으로 영구 식별을 하고 있다. 이러한 식별 작업은 랫드에게 일시적인 통증을 가하기 때문에 스트레스를 유발할 수 있으나, 랫드가 7주령되기 전에 수행하는 작업이기 때문에 랫드에게 지속적인 스트레스가 없을뿐더러, 생존율에도 영향을 주지 않는다고 판단된다.

이상의 결과, 발암성시험시 실험동물의 생존율에 영향을 주는 주요요인은 사육공간이었다. 즉, 랫드를 흡입챔버 내 철망케이지에 사육하기 보다는 사육상자에서 사육할 때 생존율이 높았다. 이외에도 철망케이지 내에 복지물품을 공급함으로써 발바닥 병변과 앞니가 끼이는 사고도 줄일 수 있었다.

실험동물은 환경의 여러 요인과 변화에 반응하고, 실험결과에 영향을 미칠 수 있다. 따라서, 환경 요인이 생물학적 과정에 영향을 미칠 수 있다는 이해가 클수록 발생하는 변수를 더 잘 제어할 수 있고, 더 나은 실험결과를 얻을 수 있다. Rao 등(1990)의 연구에서 발암성시험이 진행될수록 생존율이 감소하였는데, NTP의 권고에 따라 빈사 상태 동물을 인도적으로 처리하였기 때문이었다. 우리 연구원에서도 생존율을 인위적으로 높이기 위해 빈사 상태인 동물이 생명을 유지하는 동안 길게 끌고 가는 것은 지양할 필요가 있다. 빈사 동물을 안락사 시킴으로써 동물에 고통을 줄일 수 있고, 신체 조직이 자가 용해되는 것을 방지함으로써 좋은 조직 확보가 가능하며, 검경에서도 좀 더 명확한 결과를 도출할 수 있기 때문이다.

본 연구를 수행하면서 몇 가지 제한점이 있었다. 발암성시험의 경우 시험을 개시하여 병리학적 소견이 나오기까지 5~6년이 소요되는데, 흡입독성연구센터에서는 축적된 과거자료가 부족하다는 점, 이미 시험물질 노출이 종료된 연구들의 경우 환경적 요인 측정을 못하였기 때문에 연구들 간에 직접적인 비교 분석을 할 수 없었다는 점, 그리고 연구를 진행되는 기간 중에 사육공간 변경 및 복지물품을 공급하는 등 환경을 변경하였기 때문에 연구들 간에 비교분석에 불확실성이 존재한다는 점이 아쉬웠다.

그럼에도 불구하고 발암성시험을 연차적으로 수행하면서 환경적으로 개선점을 발굴하여 적용함으로써 실험동물의 생존율을 점차 향상시켜 왔다는 것

은 우리 모두가 노력한 결실이라고 할 수 있다. 추후 다년간 발암성시험에서 깔짚, 동물 등의 공급원을 포함한 환경적 요인, 랫드와 관련된 유전적 요인, 백혈병 유병율의 추적조사 등을 포함한 조직병리학적 자료들을 축적하여 추가적인 연구를 통하여 랫드의 사망 요인을 명확히 파악하고, 좀 더 향상된 랫드의 생존율 개선방안도 도출될 수 있을 것이다.

V. 결론

.....

V. 결론

본 연구는 랫드의 발암성시험 수행시 실험동물 생존율 향상을 위한 개선방안을 도출하기 위하여 수행하였다.

생존율을 비교하기 위하여 3개 시험군으로 구분하였다. A물질의 발암성시험은 랫드를 흡입챔버 내에 철망케이지에서 노출시험 및 사육하였으며, B물질의 발암성시험은 랫드를 69주차까지 흡입챔버 내에 철망케이지에서 노출시험 및 사육하고, 70주차부터 노출시간을 제외한 사육기간 동안 동물실의 깔짚이 깔린 사육상자에서 사육하였다. C물질의 발암성시험은 랫드를 시험시작일부터 노출시간을 제외한 사육기간 동안 동물실의 깔짚이 깔린 사육상자에서 사육하였다.

발암성시험별 대조군 수컷 랫드의 생존율은 100주차를 기준으로 A물질 34%, B물질 33%, 그리고 C물질 58%이었으며, 대조군 암컷 랫드의 생존율은 A물질 60%, B물질 65%, 그리고 C물질 73%로 발암성시험이 연차적으로 진행될수록 생존율이 유의하게($P<0.01$) 증가하였다.

흡입챔버 내의 철망케이지에서 사육한 랫드는 노출시작 후 1년 이내에 본격적으로 사망하였으며, 노출시간을 제외한 사육기간 동안 깔짚이 깔린 사육상자에서 사육한 랫드는 노출시작 후 1년 이후에 본격적으로 사망하였다.

노출기간 동안 가스상 물질의 농도를 측정한 결과, 산소농도는 모두 기준치 19%이상을 충족하였으며, 이산화탄소농도는 사육상자 500~1,400 ppm, 흡입챔버 내 200~300 ppm 이었고, 암모니아와 황화수소는 검출되지 않았다.

소음을 측정한 결과, 동물실과 흡입챔버실은 각각 49.37~49.67 dB과 56.33~57.77 dB 수준으로 기준치 60 dB 미만을 충족하였고, 흡입챔버 내부의 충격소음은 대조군과 노출군 각각 82.73 dB, 82.07 dB이었으나, 일 2회 단시간동안만 발생하는 소음으로 랫드 생존율에 영향을 주지 않는다고 판단되었다.

조도를 측정한 결과, 동물실 중앙이 281.31 Lux로 가장 높았으며 사육랙의 최상단은 32.56 Lux, 최하단은 17.01 Lux 이었다. 흡입챔버 내부의 경우 최상단은 104.43~140.51 Lux, 최하단은 71.57~114.69 Lux로 청정동물실 내부의 조도는 300 Lux미만으로 기준치를 충족하였다.

온도를 측정한 결과, 동물실과 흡입챔버실은 각각 23.0~23.7℃와 22.7~23.7℃이었고, 대조군과 노출군 흡입챔버 내의 온도는 모두 22.6℃를 유지하여 $22\pm3^{\circ}\text{C}$ 기준치를 충족하였다.

상대습도를 측정한 결과, 동물실과 흡입챔버실은 각각 43.9~45.2%와 46.4~46.9%이었으며, 대조군과 노출군 흡입챔버 내의 상대습도는 45.6%와 47.5%를 유지하여 $50\pm20\%$ 기준치를 충족하였다.

시간당 환기횟수를 측정한 결과 동물실과 흡입챔버실의 환기횟수는 13.97~15.10 회/h였으며, 흡입챔버 내부의 환기횟수는 11.9회/h로 기준치 시간당 10회 이상을 충족하였다.

청정실과 사무실, 그리고 세척실은 각각 물리적으로 구역 분리가 되어 있고, 청정실내 실험실간의 교차오염 및 해충에 의한 오염을 최소화하여 랫드에게 영향을 주는 요인은 아니라고 판단되었다.

실험동물용 고형사료는 중금속, 곰팡이류, 유기화합물 등이 모두 기준치 미만으로 적합하였으며, 음용수는 수질검사에서 일반세균, 중금속, 유기화합물 등이 모두 기준치 미만이거나 검출되지 않았다. 또한, 깔짚에서도 중금속 및 잔류농약 등이 모두 기준치 미만이거나 검출되지 않았으며, 랫드에게 생존율에 영향을 주지 않는다고 판단되었다.

살충제, 살균제, 세제는 랫드를 흡입챔버 내 또는 사육상자에 격리한 후 사용하여 화학적 요인의 영향을 최소화하였으며, 랫드에게 생존율에 영향을 주지 않는다고 판단되었다.

실험동물에게 제공되는 복지물품은 중금속이나 잔류 농약 등이 기준치 미만이었으며, 건강에 해로운 유해물질도 없었다. 철망케이지 내에 복지물품인 대형 목판을 제공하여 랫드의 발가락 절단 상해를 줄일 수 있었으며, 철망케이지 그물망에 앞니가 끼이는 사고도 줄일 수 있었다.

이상의 결과, 여러 가지 요인 중에서 발암성시험 수행시 실험동물의 생존율을 높일 수 있는 방안은 흡입챔버 내부가 아닌 사육상자에서 사육하는 것이었다. 또한, 복지물품 공급, 작업방법 변경으로 랫드의 상해를 줄여서 생존율에 긍정적인 영향을 주었다.

참고문헌

- 농림축산검역본부, 식품의약품안전처, 위원회(IACUC) 표준운영 가이드라인. p. 65, p. 13,5 농림축산검역본부.(2020)
- Armario A, Ortiz R, and Balasch J, Effect of crowding on some physiological and behavioral variables in adult male rats. *Physiol. behav.* **32**, 35-37, 1984c
- Armario A, Castellanos JM and Balasch J, Chronic noise stress and insulin secretion in male rats. *physiol. Behav.* **34**, 359-361, 1985
- Baumans V and van de Weerd HA, Enrichment of laboratory animal housing; basic need or luxury? *Scand. Lab. Anim. Sci.* **23(Suppl 1)**, 93-95, 1996
- Borges JM, Edward DP and Tso MO, A comparative study of photic injury in four inbred strains of albino rats. *Curr. Eye Res.* **9**, 799-803, 1990
- Boyle E and Villanueva PA, Hyperbaric oxygen seizures in rats; effects of handling and chamber noise. *Lab. Anim. Sci.* **26**, 100-101, 1976
- Brain P and Benton D, The interpretation of physiological correlates of differential housing in laboratory rats. *Life Sci.* **24**, 99-116, 1979
- Brain P and Benton D, Conditions of housing, hormones, and aggressive behavior. In "Hormones and Aggressive Behavior." (B.B. Svare, ed.), pp. 351-372, Plenum Press, New York (1983)

- Burek JD and Schwetz BA, Considerations in the selection and use of chemicals within the animal facility. *Lab. Anim. Sci.* **30**, 414-421, 1980
- Castelharno-Carlos MJ and Baumans V, The impact of light, noise, cage cleaning and in-house transport on welfare and stress of laboratory rats, *Lab. Anim.* **43**, 311-327, 2009
- Clough G, Environmental effects on animals used in biomedical research. *Biol. Rev.* **57**, 487-523, 1982
- Cough G, Environmental factors in relation to the comfort and well-being of laboratory rats and mice. In "Standards In Laboratory Animal Management: Part 1." pp. 7-24, Universities Federation for Animal welfare, Herfordshire, United Kingdom (1984)
- Conney AH and Burns JJ, Metabolic interactions among environmental chemicals and drugs. *Science* **178**, 576-586, 1972
- Douglas GR, Nestmann ER and Lebel G, Contribution of chlorination to the mutagenic activity of drinking water extracts in Salmonella and Chinese hamster ovary cells. *Environ. Health Perspect.* **69**, 81-87, 1986
- dymsha HA, Miller SA, Maloney JF and foster HL, Equilibration of the laboratory rat following exposure to shipping stresses. *Lab. Anim. Care* **13**, 60-65, 1963
- Feldman D and Krishnan A, Estrogens in unexpected places: possible implications for researchers and consumers. *Environ. Health Perspect.* **103(suppl 7)**, 129-133, 1995
- Flynn RJ, A new cage cover as an aid to laboratory rodent disease

- control. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **129**, 714-717, 1968
- Foster CHL, Trexler PC and Rumsey G, A canned sterile shipping diet for small laboratory rodents. *Lab. Anim. Care* **17**, 400-405, 1967
- Gerges SE, Abdel-Rahman MS, Skowronski GA and Von Hagen S, Effects of Alcide gel on fetal development in rats and mice, II. *J. Appl. Toxicol.* **5**, 104-109, 1985
- Goldstein D, Convulsions elicited by handling: a sensitive method of measuring CNS excitation in mice treated with reserpine or convulsant drugs. *Psychopharm.* **32**, 27-32, 1973
- Hasenau JJ, Baggs RB and Kraus AL, Microenvironments in microisolation cages using BALB/c and CD-1 mice. *Contemp. Top. Lab. Anim. Sci.* **32**, 11-16, 1993
- Howdeshell KL, Peterman PH, Judy BM, Taylor JA, Orazio CE, Ruhlen, RL, vom Saal FS and welshons WV, Bisphenol A is released from used polycarbonate animal cages into water at room temperature. *Environ. Health Perspect.* **111**, 1180-1187, 2003
- Joseph IM, Suthanthirarajan N and Namasivayam A, Effect of heat stress on certain immunological parameters in albino rats. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* **35**, 269-271, 1991
- Kanzaki M, Fujieda M and Furukawa T, Effects of suspension of air-conditioning on airtight-type racks. *Exp. Anim.* **50**, 379-385, 2001
- Kaplan EL and Meier P, Nonparametric estimation from incomplete observations. *J. Am. Stat. Assoc.*, **53**, 457-481, 1958
- Kerns WD, Pavlov KL, Donofrio DJ, Gralla EJ and Swenberg JA,

- Carcinogenicity of formaldehyde in rats and mice after long-term inhalation exposure. *Cancer Research* **43**, 4382-4392, 1983
- Knapka JJ, Nutrition of rodents. *Vet. Clin. N. Am. Exot. Anim. Pract.* **2**, 153-167, 1999
- Krishnan AV, Stathis P, Permuth SF, Tokes L and Feldman D, Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* **132**, 2279-2286, 1993
- Krynicky M and Olszewski WL, Influence of thermal stress on lymphocyte migration pattern in rats. *Arch. Immunol. Ther. Exp.(Warsz)* **37**, 601-607, 1989
- Lambert HH, Continuous red light induces persistent estrus without retinal degeneration in the albino rat. *Endocrinology* **97**, 208-210, 1975
- Lang C and Vesell ES, Environmental and genetic factors affecting laboratory animals: impact on biomedical research. *Fed. Proc., Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **35**, 1123-1124, 1976
- Liimataiense A, Muller D, Vartianinen T, Jahn F, Kleeberg U, Klinger W and Hanninen O, Chlorinated drinking water is mutagenic and causes 3-methylcholanthrene type induction of hepatic monooxygenase. *Toxicology* **51**, 281-289, 1988
- Lundberg V, Dominanzstrukturen mannlicher laborratten. *Zeitschr. Versuchstierk*, **28**, 257-268, 1986
- Matsumoto M, Kasia T, Saito A, Takanobu K, Senoh H, Umeda Y and Kanno J. Carcinogenicity of butyl 2,3-epoxypropyl ether in rats and mice by whole body inhalation for two years. *J. Toxicol. Sci.* **45(1)**, 1-14, 2020

- Militzer K and Reinhard HJ, Rank position in rats and their relations to tissue parameters. *Physiol. Psychol.* **10**, 251-260, 1982
- Murakami H, Difference between internal and external environment of the mouse cage. *Lab. Anim. Sci.* **21**, 680-684, 1971
- Newberne PM and Fox JG, Chemicals and toxins in the animal facility. In "Laboratory Animal Housing." PP. 118-138, Institute of Laboratory Animal Resources, National Academy of Sciences, Washington, DC.(1978)
- Nunez MJ, Mana P, Linares D, Riveiro MP, Balboa J, Suarez-Quintanilla J, Maracchi M, Mendez MR, Lopez JM and Freire-Garabal M, Music, immunity and cancer. *Life Sci.* **71**, 1047-1057, 2002
- OECD, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals : Test No. 451 Carcinogenicity studies(25 June 2018)
- Peace TA, Singer AW, Niemuth NA and Shaw ME, Effects of caging type and animal source on the development of foot lesions in Sprague Dawley rats(*Rattus norvegicus*). *Contemp. Top. Lab. Anim. Sci.* **40**, 17-21, 2001
- Perkins SE and Lipman NS. Evaluation of microenvironmental conditions and noise generation in three individually ventilated rodent caging systems and static isolator cages. *Contemp. Top. Anim, Sci.* **35**, 61-65, 1996
- Peterson EA, Noise and laboratory animals. *Lab. Anim. Sci.* **30**, 422-439, 1980
- Peto R, Pike MC, Armitage P, Breslow NE, Cox DR, Howard SV, Mantel N, McPherson K, Peto J and Smith PG, Design and

- analysis of randomized clinical trials requiring prolonged observation of each patient. II. analysis and examples. *Br. J. Cancer*, **35**, 1-39, 1977
- Pfaff J, Noise as an environmental problem in the animal house. *Lab Anim.* **8**, 347-354, 1974
- Rao GN, Haseman JK, Grumbein S, Crawford DD, and Eustis SL, Growth, body weight, survival, and tumor trends in F344/N rats during an eleven-year period, *Toxicologic pathology*, **18(1 part 1)**, 61-70, 1990
- Ras T, Van De Ven M, Patterson-Kane EG and Nelson K, Rats' preferences for corn versus wood-based bedding and nesting materials. *Lab. Anim.* **36**, 420-425, 2002
- Robert EF and Jack RH, The Laboratory Rat: Chapter 10 Housing and Environment, 2nd edition, pp. 303-337, Elsevier.(2006)
- Robinson EC and Nair RS, The genotoxic potential of linear alkylbenzene mixtures in a short-term test battery. *Fundam. Appl. Toxicol.* **18**, 540-548, 1992
- Robinson EC and Schroeder RE, Reproductive and developmental toxicity studies of a linear alkylbenzene mixture in rats. *Fundam. Appl. Toxicol.* **18**, 549-556, 1992
- Saito TR, Motomura N, Taniguchi K, Hokao R, Arkin A, Takahashi KW and Sato NL, Effect of cage size on sexual behavior pattern in male rats. *Contemp. Top. Lab. Anim. Sci.* **35**, 80-82, 1996
- Sharp PE and LaRegina MC, "The Laboratory Rat." p. 30, CRC Press, Boca Raton.(1998)
- Skowronski GA, Abdel-Rahman MS, Gerges SE and Klein KM, Teratologic evaluation of Alcide liquid in rats and mice, I. *J.*

- Appl. Toxicol.* **5**, 97-103, 1985
- Stark. DM., Wire-Bottom Versus Solid-Bottom Rodent Caging Issues Important to Scientists and Laboratory Animal Science Specialists, Contemporary Topics, *American Association for Laboratory Animal Science*, **40(6)**, 11-14, 2001
- Weisbroth SH, Paganelli RG and Salvia M, Evaluation of a disposable water system during shipment of laboratory rats and mice. *Lab. Anim. Sci.* **27**, 186-194, 1977
- Yamamoto S, Ando M and Suzuki E, High-temperature effects on antibody response to viral antigen in mice. *Exp. Anim.* **48**, 9-14, 1999
- Turturro A, Witt WW, Lewis S, Hass BS, Lipman RD and Hart RW, Growth Curves and Survival Characteristics of the Animals Used in the Biomarkers of Aging Program, *Biological Sciences*, vol. **54A(11)**, B492-B501, 1999
- Guidelines for the Housing of Rats in Scientific Institutions(Animal Research Review Panel(ARRP) Guideline 20), https://www.animaethics.org.au/__data/assets/pdf_file/0014/222512/housing-rats-scientific-institutions.pdf

Abstract

Improvement measures to improve the survival rate of experimental animal(rat) in carcinogenicity tests

(Objectives) This study was intended to derive an improvement plan to increase the survival rate of experimental animals, while conducting a carcinogenicity test in rats.

(Methods) In order to compare the survival rate of rats, it was divided into three carcinogenicity test groups. For the carcinogenicity test of substance A, rats were exposed and bred in wire mesh cages in the inhalation chamber. For the carcinogenicity test of substance B, rats were exposed and bred in wire mesh cages in the inhalation chamber from the start of the test to the 69th week, and from the 70th week to the end the test, rats were bred in a breeding box in the animal room, except for the exposure time. For the carcinogenicity test of substance C, rats were bred in a breeding box in the animal room during the breeding period, excluding the exposure time from the test start date.

(Results) The survival rate for each carcinogenicity test was based on the 100th week. The survival rates of control male rats was 34% for material A, 33% for material B, and 58% for material C. The survival rates of control female rats was 60% for material A, 65% for material B, and

73% for material C.

Rats bred in wire mesh cages in the inhalation chamber started to die in earnest within one year, and the rats bred in a breeding box during the breeding period, excluding the exposure time began to die in earnest after one year.

The welfare products provided to the rats contained heavy metals or pesticide residues below the standard, and there were no harmful substances to health. It was possible to reduce the rat's toe amputation injury by providing a large wood block, which is a welfare item, in the wire mesh cage. Additionally, it was possible to reduce the accidents in which the incisor were caught in the wire mesh cage netting.

(Conclusions) In conclusion, among various factors, the method to increase the survival rate of rats when performing a carcinogenicity test was to breed them in a breeding box, not inside the inhalation chamber. Additionally, it was possible to have a positive effect on the survival rate by reducing the injury of the rats by supplying welfare products and changing the working method.

부록

[부록1] 사료 성적서



2918C

Teklad Certified Irradiated Global 18% Protein Rodent Diet

Lot Number **2918C-022320MA**

Date of Manufacture **23Feb2020**

Report Date **03Mar2020**

+++++

ENVIGO

Laboratory Diet Certification Report

The following data is a consolidation of results obtained from one or more independent testing laboratories. The actual laboratory results are available upon request.

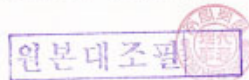
2020.03.06
15:55:12 -06'00'

Barbara O. Madelon
Nutritionist

Analysis	Result	Units	Established Maximum Concentration
Heavy Metals			
Arsenic	< 0.10	ppm	1.00
Cadmium	< 0.10	ppm	0.50
Lead	< 0.20	ppm	1.50
Mercury	< 0.05	ppm	0.20
Selenium	0.24	ppm	0.50
Mycotoxins			
Aflatoxin B1, B2, G1, G2	< 5.00	ppb	5.00
Chlorinated Hydrocarbons			
Aldrin	< 0.01	ppm	0.03
Lindane	< 0.01	ppm	0.05
Chlordane	< 0.01	ppm	0.05
DDT & related substances	< 0.03	ppm	0.15
Dieldrin	< 0.02	ppm	0.03
Endrin	< 0.02	ppm	0.03
Heptachlor	< 0.01	ppm	0.03
Heptachlor Epoxide	< 0.01	ppm	0.03
Toxaphene	< 0.10	ppm	0.15
PCBs	< 0.10	ppm	0.15
α-BHC	< 0.01	ppm	0.05
β-BHC	< 0.01	ppm	0.05
δ-BHC	< 0.01	ppm	0.05
Hexachlorobenzene	< 0.01	ppm	0.03
Mirex	< 0.01	ppm	0.02
Methoxychlor	< 0.05	ppm	0.50
Organophosphates			
Thimet	< 0.15	ppm	0.50
Diazinon	< 0.14	ppm	0.50
Disulfoton	< 0.15	ppm	0.50
Methyl Parathion	< 0.14	ppm	0.50
Malathion	< 0.14	ppm	0.50
Parathion	< 0.12	ppm	0.50
Thiodan	< 0.02	ppm	0.50
Ethion	< 0.14	ppm	0.50
Trithion	< 0.15	ppm	0.50

Teklad Global Diets is a trademark of Envigo. © Envigo 2015

Envigo Teklad Diets + Madison WI + envigo.com + tekladinfo@envigo.com + (800) 483-5523



Certificate Of Processing

Prepared for ENVIGO RMS INC



Gamma Process Run ID 109080A

Product Code	Product Lot Number	Quantity	UOM
T.2918C.15	022320MA	61	BG
Cust Item ID: T.2918C.15 (KOREA)			
T.7912.15	022420M	84	BG
T.7913.15	022120M	625	BG
T.8904.15	022120M	360	BG

Other Information:

PO# 651265

Processing Run Start Date/Time: 28-Feb-2020 03:11:54 pm Approx. Downtime (hours): 0.00
Processing Run End Date/Time: 29-Feb-2020 12:37:15 am

Minimum Specified Dose (kGy):	20.0	Minimum Delivered Dose (kGy):	21.8
Maximum Specified Dose (kGy):	50.0	Maximum Delivered Dose (kGy):	42.6

Product meets Customer specifications; zero nonconformities occurred during this irradiation run.

Signature Manifest

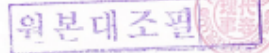
Reviewed and E-Signed By
 Soto, Brittany (QS & RC Technician)
Document Content Revision: 1

Signed On 3/3/2020 at 12:17 PM
UTC / GMT Offset (hh:mm): -6:00

Processing Location:

STERIS
2500 Commerce Drive
Libertyville, IL 60048
Phone: 847-247-0970
Fax: 847-247-0882

Operating facilities are in compliance with applicable state and federal regulations (FDA, NRC, EPA, and OSHA) and provide services under a quality system which meets the requirements of FDA QSR, ENISO 13485, and in alignment with EN ANSI/AAMI/ISO 11137. STERIS certifies that these processed items received the indicated doses within the precision and accuracy of the dosimetry system used.



[부록2] 음용수 성적서

SHINSEUNG

(주)신성생명환경연구원

본 사 : 충남 당진시 서해로 6163-36
 회원실 : 충남 예산시 대항읍 호서로 79번길 20
 호서대학교 병치환조영학과
 전화 1899-5204 전속 041-542-5745

문서번호 신성21-11-01164
 수 신 산업안전보건연구원
 제 목 시험성적통보

품질책임 박 정 의
 시험일자 2021년 04월 15일
 발 신 (주)신성생명환경연구원



본 연구원에 의뢰한 시료에 대한 수질검사결과는 다음과 같습니다.

1. 시료내용

접수 번호	21-11-01164	접수 일자	2021년 04월 05일	채수 일자	2021년 04월 05일
의뢰인	산업안전보건연구원	연락처			
채수 장소	대전광역시 유성구 엑스포로339번길 30 (문지동, 산업안전보건연구원)				
시료명	수도수	검사 목적	참고용	시료채취자	(주)신성생명환경연구원 이주현

2. 수질검사결과

NO	검사항목명	검사기준	검사결과	NO	검사항목명	검사기준	검사결과
1	일반세균	100 cfu/mL 이하	0	2	사염화소	0.002 mg/L 이하	불검출
3	총대장균군	불검출/100 mL	불검출	4	유리잔류염소	4.0 mg/L 이하	불검출
5	분변성대장균군/대장균	불검출/100 mL	불검출	6	1,2-디브로모-3-클로로프로판	0.003 mg/L 이하	불검출
7	납	0.01 mg/L 이하	불검출	8	솔트리활성탄	0.1 mg/L 이하	0.037
9	셀소	1.5 mg/L 이하	불검출	10	브로모디클로로메탄	0.03 mg/L 이하	0.003
11	비소	0.01 mg/L 이하	불검출	12	디브로모클로로메탄	0.1 mg/L 이하	불검출
13	세라늄	0.01 mg/L 이하	불검출	14	클로로포름	0.00 mg/L 이하	0.033
15	수은	0.001 mg/L 이하	불검출	16	경도	300 mg/L 이하	76
17	시안	0.01 mg/L 이하	불검출	18	국방안전실험소비밀	10 mg/L 이하	2.0
19	크롬	0.05 mg/L 이하	불검출	20	냄새	무취	없음
21	암모니아질소	0.5 mg/L 이하	불검출	22	맛	무미	없음
23	총산성질소	10 mg/L 이하	불검출	24	중	1 mg/L 이하	불검출
25	카드뮴	0.005 mg/L 이하	불검출	26	석도	5도 이하	1
27	세균(총아메바계열생체)	0.5 mg/L 이하	불검출	28	피부	0.005 mg/L 이하	불검출
29	수소이온농도	5.8 - 8.5	6.8	30	다이아지논	0.02 mg/L 이하	불검출
31	마연	3 mg/L 이하	불검출	32	파라타론	0.00 mg/L 이하	불검출
33	몰소이론	250 mg/L 이하	불검출	34	헥사플로타론	0.04 mg/L 이하	불검출
35	중금속류	500 mg/L 이하	68	36	카바릴	0.07 mg/L 이하	불검출
37	불	0.3 mg/L 이하	불검출	38	1,1,1-트리클로로에탄	0.1 mg/L 이하	불검출
39	알칸	0.05 mg/L 이하	불검출	40	테트라클로로에틸렌	0.01 mg/L 이하	불검출
41	악도	0.5 NTU 이하	0.07	42	헥사클로로에틸렌	0.00 mg/L 이하	불검출
43	황산이온	200 mg/L 이하	불검출	44	디클로로메탄	0.02 mg/L 이하	불검출
45	말루미스	0.2 mg/L 이하	불검출	46	벤젠	0.01 mg/L 이하	불검출
47	클로로알라드라이드	0.03 mg/L 이하	불검출	48	톨루엔	0.7 mg/L 이하	불검출
49	디브로모아세토니트릴	0.1 mg/L 이하	불검출	50	에틸벤젠	0.3 mg/L 이하	불검출
51	디클로로아세토니트릴	0.09 mg/L 이하	불검출	52	크실렌	0.5 mg/L 이하	불검출
53	트리클로로아세토니트릴	0.004 mg/L 이하	불검출	54	1,1-디클로로에틸렌	0.03 mg/L 이하	불검출
55	할로아세틱에시드	0.1 mg/L 이하	불검출	56	1,4-다이옥산	0.05 mg/L 이하	불검출
57	포름알데히드	0.5 mg/L 이하	불검출	58	불소	1.0 mg/L 이하	불검출
59	분류산염	0.01 mg/L 이하	불검출				
판 정		기준에 적합					
수질기준초과항목							
참 조							

비고 : 본 성적서는 검사목적 이외의 용도로 사용할 수 없습니다.

[부록3] 깔짚 성적서

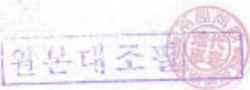


测试报告

(Test Report)

No. BNARIRGR12746508

样品名称 (Sample Description)	杨木制品 ALBA Beta Chip (DY-6606)
委托单位 (Applicant)	邳州市小河科技发展有限公司 Pizhou Dongfang Breeding Co., Ltd.





测试结果

(Test Results)

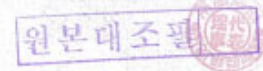
No. BNARIRGR12746508

第 1 页, 共 2 页 (page 1 of 2)

样品名称 (Sample Description)	杨木制品	样品规格 (Sample Specification)	10kg/袋
委托单位 (Applicant)	邳州市小河科技发展有限公司	商标 (Trade Mark)	—
到样日期 (Received Date)	2019-08-06	生产日期或批号 (Manufacturing Date or Lot No.)	2019 年 7 月 25 日
测试日期 (Test Date)	2019-08-06~2019-08-13	样品等级 (Sample Grade)	—
样品数量 (Sample Quantity)	30 袋	测试类别 (Test Type)	委托测试
样品状态 (Sample Status)	包装完好	测试环境 (Test Environment)	符合要求
测试项目 (Test Items)	见下页		
参考方法 (Reference Methods)	见下页		
所用主要仪器 (Main Instruments)	电子分析天平、原子吸收光谱仪、气相色谱仪等		
备注 (Note)	—		
	编制人 (Edited by)	余仁仁	
	审核人 (Checked by)	周梦翔	
	批准人 (Approved by)	廖修华	
	签发日期 (Issued Date)	2019 年 08 月 13 日	

© Hotline 400-819-5688
www.ponytest.com

谱尼测试集团上海有限公司
公司地址: 上海市松江区文苑东路 99 号 7 幢 2 层
检测地址: 上海市徐汇区桂平路 680 号 35 幢 2-4 楼, 6 楼



电话: 021-37895599



测试结果

(Test Results)

No. BNARIRGR12746508

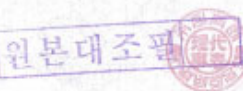
第 2 页, 共 2 页 (page 2 of 2)

样品名称和编号 (Sample Description and Number)	测试项目 (Test Items)	测试结果 (Test Result)	参考方法 (Reference Methods)
R12746508 杨木制品	砷 (As), mg/kg	0.019	GB 5009.11-2014
	铅 (Pb), mg/kg	未检出 (<0.02)	GB 5009.12-2017
	汞 (Hg), mg/kg	未检出 (<0.0025)	GB 5009.17-2014
	镉 (Cd), mg/kg	未检出 (<0.001)	GB 5009.15-2014
	铬 (Cr), mg/kg	0.30	GB 5009.123-2014
	硒 (Se), mg/kg	未检出 (<0.01)	GB 5009.93-2017
	Aldrin 艾氏剂, mg/kg	未检出 (<1.59×10 ⁻⁴)	GB/T 5009.19-2008
	Lindane 林丹, mg/kg	未检出 (<0.0002)	NY/T 761-2008
	Dieldrin 狄氏剂, mg/kg	未检出 (<1.37×10 ⁻⁴)	GB/T 5009.19-2008
	Endrin 异狄氏剂, mg/kg	未检出 (<4.81×10 ⁻⁴)	GB/T 5009.19-2008
	Chlordane 氯丹, mg/kg	未检出 (<3.07×10 ⁻⁴)	GB/T 5009.19-2008
	Heptachlor 七氯, mg/kg	未检出 (<2.47×10 ⁻⁴)	GB/T 5009.19-2008
	Hexachlorobenzene 六氯苯, mg/kg	未检出 (<0.0002)	NY/T 761-2008
	Mirex 灭蚊灵, mg/kg	未检出 (<1.27×10 ⁻⁴)	GB/T 5009.19-2008
	Phorate 甲拌磷, mg/kg	未检出 (<0.02)	NY/T 761-2008
	Disulfoton 乙拌磷, mg/kg	未检出 (<0.02)	NY/T 761-2008
	Methyl Parathion 甲基对硫磷, mg/kg	未检出 (<0.01)	NY/T 761-2008
	Malathion 马拉硫磷, mg/kg	未检出 (<0.03)	NY/T 761-2008
	Parathion 对硫磷, mg/kg	未检出 (<0.02)	NY/T 761-2008
	Endosulfan 硫丹, mg/kg	未检出 (<3.82×10 ⁻⁴)	GB/T 5009.19-2008
	Ethion 乙硫磷, mg/kg	未检出 (<0.02)	NY/T 761-2008
	Trithion 三硫磷, mg/kg	未检出 (<0.0250)	GB 23200.8-2016

以下空白
(End of Report)

☎ Hotline 400-819-5688
www.ponytest.com

谱尼测试集团上海有限公司
公司地址: 上海市松江区文翔东路 99 号 7 幢 2 层
检测地址: 上海市徐汇区桂平路 680 号 35 幢 2-4 楼、6 楼



电话: 021-37895599

测试结果
 (Test Results)

No. BNARS19R41186708

第 2 页, 共 2 页 (page 2 of 2)

样品名称和编号 (Sample Description and Number)	测试项目 (Test Items)	测试结果 (Test Result)	参考方法 (Reference Methods)
Aflatoxin	黄曲霉毒素总量, $\mu\text{g/kg}$	未检出 (<0.003)	GB 5009.22-2016
CFU/ Bacterial Count	菌落总数, CFU/g	35	GB 4789.2-2016
Coliform	大肠菌群, MPN/g	未检出 (<0.3)	GB 4789.3-2016
Pseudomonas	铜绿假单胞菌, /25g	未检出	SN/T 2099-2008
Salmonella	沙门氏菌, /25g	未检出	GB 4789.4-2016
R41186708 杨木制品	CFU/ Mould 霉菌, CFU/g	25	GB 4789.15-2016
Epoxide	环氧七氯, mg/kg	未检出 (<0.01)	PONY-SHXZSP223-2009A
Methoxychlor DDT	甲氧氯, 甲氧滴滴涕, mg/kg	未检出 (<0.01)	PONY-SHXZSP223-2009A
Aldrin	艾氏剂, mg/kg	未检出 (<0.01)	PONY-SHXZSP223-2009A
PCB	多氯联苯 (以 PCB28、 PCB52、PCB101、 PCB118、PCB138、 PCB153 和 PCB180 总和计), $\mu\text{g/kg}$	未检出 (<0.5)	GB 5009.190-2014

 以下空白
 (End of Report)

 © Hotline 400-819-5688
 www.ponytest.com

 谱尼测试集团上海有限公司
 公司地址: 上海市松江区文翔东路 99 号 7 幢 2 层
 检测地址: 上海市松江区桂平路 680 号 35 幢 2-4 楼、6 楼

电话: 021-37895599


시험성적서

- 주소 : 대전광역시 유성구 용산동 테크노2로 125-7
 (주)한국분석기술연구소
- Tel : 042-823-7241
- Fax : 042-823-6263

- 성적서 번호 : T200433
- 페이지 : (1) / (총 2)

1. 의뢰자
 - 기관명 : (주)두얼바이오텍
 - 의뢰자 : 최양환
 - 전화/팩스 : 02-575-6598 / --
 - 주소 : 서울시 서초구 양재천로 17길 14
2. 시험성적의 용도 : 참고용
3. 시료명 (수량) : 실험동물용팔집 ALBA Beta Chip(DY-6606) 포함 총 1건
4. 시험기간 : 2020.10.23 ~ 2020.10.28
5. 분석장비 및 시험방법 :
6. 시험결과 : 별첨

확인	작성자		승인자	
	직위	연구원	기술책임자 직위	분석팀장
	성명	이민경	성명	서민정 

2020년 10월 28일

(주) 한국분석 기술연구소 대표이사



☑ 본 성적서는 고객이 제공한 시료를 시험한 결과로서 전체 제품에 대한 품질을 보증하지 않음.

☑ 본 성적서는 상기 용도 이외 사용을 할 수 없으며 광고, 전단, 홍보 및 법적 소송의 수단으로 사용할 수 없음.

☑ 본 결과는 의뢰자가 제공한 시료로부터 얻은 것으로 유사 대상 시료에 적용할 수 없음.

원본대조필 

시험결과

성적서 번호
Test No.

T200433

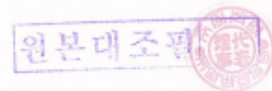
(2) 페이지 중 (2) 페이지
Page of Page

[illegible]

안전성검사기관 지정번호 : 제 17 호

시험성적서					
● 접수번호 : PG200345					
신청인	성명(법인명)	㈜두얼바이오텍		생년월일(사업자번호)	
	주소	서울시 서초구 양재천로 17길 14		전화번호	02-575-6598
생산자	성명(생산단체)	PIZHOU DONGFANG社			
	생산지(재배필지)	중국			
접수일자	2020-10-23				
검사품목	실험동물용감집 ALBA Beta Chip(DY-6606) Lot. No : DYP-201012M	인증종류		인증번호	
검사목적	참고용				
검사항목	잔류농약 320 성분				
검사결과	검출성분	검출치(mg/kg)		잔류허용기준(mg/kg)	
	불검출				
담당검사원	성명	김현주	기술책임자	서민정	
위와 같이 시험성적서를 교부합니다.					
2020-10-27					
(주)한국분석기술연구소 대표이사 					
「농수산물품질관리법」 제64조에 따라 국립농산물품질관리원장이 지정한 안전성검사기관입니다.					
※ 기타 참고사항 - 상기 내용은 의뢰자가 제공한 시료에 대한 결과이고 용도 외 사용을 금합니다. - 시험성적서의 일부분이 복사되어 사용하는 것을 금합니다. - KS Q ISO/IEC 17025와 KOLAS 인정받은 일부 항목이 포함되어 있습니다. - 시험성적서의 진위 확인은 Tel 042-823-7241 연락주시기 바랍니다.					

KR-QPF-16-03(01)



[부록4] 목판 성적서


시험성적서

▪ 주소 : 대전광역시 유성구 유산동 테크노2로 125-7
한국분석기술연구소

▪ Tel : 042-823-7241 ▪ Fax : 042-823-6263

▪ 성적서 번호 : T210043

▪ 페이지 : (1) / (총 2)

1. 의뢰자

▪ 기관명 : (주)두얼바이오텍

▪ 의뢰자 : 최양환

▪ 전화/팩스 : 02-575-6598 / --- ▪ 의뢰일자 : 2021.01.26

▪ 주소 : 서울시 서초구 양재천로 17길 14

2. 시험성적의 용도 : 참고용

3. 시료명(수량) : Enrichment Block 포함 총 1건

4. 시험기간 : 2021.01.26 ~ 2021.01.29

5. 분석기기 :

6. 시험결과 : 별첨

확인	작성자		승인자	
	직위	연구원	기술책임자 직위	센터장
	성명	이민경	성명	서민정

2021년 01월 29일

(주) 한국분석 기술연구소 대표이사



① 본 성적서는 고객이 제공한 시료를 시험한 결과로서 전체 제품에 대한 품질을 보증하지 않음.

② 본 성적서는 상기 용도 이외의 사용을 할 수 없으며 광고, 전단, 홍보 및 법적 소송의 수단으로 사용할 수 없음.

③ 본 결과는 의뢰자가 제공한 시료로부터 얻은 것으로 유사 대상 시료에 적용할 수 없음.

원본대조필

시험결과

성적서 번호
Test No.

T210043

(2) 페이지 중 (2) 페이지
Page of Page

시료	원소	분석결과	단위	정량한계	시험방법
Enrichment Block	Cd	0.15	mg/kg	0.1	ICP-MS
	Hg	불검출	mg/kg	0.1	Hg Analyzer
	Pb	불검출	mg/kg	0.1	ICP-MS
이하여백					
비고					

원본대조필



Certificate

of gamma irradiation



Certificate No. : S 210929 2 3590
 Customer : ㈜두얼바이오텍
 Irradiation Batch No. : 210927-32
 Irradiation Container : 25 ~ -
 Dosimetry Results : - ~ 14.61 kGy
 Irradiated Date (Time) : 29-Sep-21 (12:10 AM)
 Total exposure Time : 7:57 (h:min)

Item Specification	QTY(Kg)	Lot No.	Specified Dose(kGy)	
			Dmin	Dmax
Enrichment Block	50	-	-	15
Total	50			

* Affirmation

Date : 29-Sep-21
 Approved : Wan Sik, Kim

(Q.M.R / Director)

We hereby certify that the above specified goods have been duly irradiated by gamma-ray.

(상기에 명시된 제품은 정히 조사되었음을 확인합니다.)



EN / ISO 13485
 EN / ISO 11137-1
 Certified



Registered :
 Contract sterilizer



厚生労働省
 Ministry of Health, Labour and Welfare



Technology for better life
SOYAGREENTEC

Address : 34-26, Jeyakgongdan 2-gil, Hyangnam-eup, Hwaseong-si,
 Gyeonggi-do, 18622, Korea

TEL : +82-31-353-6999
 FAX : +82-31-353-6979

원본대조필



(Form : PQ-101-10)

(Rev : 20.12.14.)

연구진

연 구 기 관 : 산업안전보건연구원

연구책임자 : 이성배 (연구위원, 흡입시험연구부)

연 구 원 : 김경문 (과장, 흡입시험연구부)

연 구 원 : 박가영 (과장, 흡입시험연구부)

연구기간

2021. 01. 02. ~ 2021. 11. 30.

본 연구보고서의 내용은 연구책임자의 개인적 견해이며,
우리 연구원의 공식견해와 다를 수도 있음을 알려드립니다.

산업안전보건연구원장

발암성시험의 실험동물(랫드) 생존율 향상을 위한 개선 방안
(2021-산업안전보건연구원-800)

발 행 일 : 2021년 11월 30일

발 행 인 : 산업안전보건연구원 원장 김은아

연구책임자 : 산업화학연구실 연구위원 이성배

발 행 처 : 안전보건공단 산업안전보건연구원

주 소 : (44429) 울산광역시 중구 종가로 400

전 화 : 042-869-8513

팩 스 : 042-869-8693

Homepage : <http://www.kosha.or.kr/oshri>

I S B N : 979-11-92138-34-3