

랫드에 주입된 세피오라이트에 의한 폐기능 변화 및 생체내구성 평가

정용현^{†1} · 한정희¹ · 성재혁¹ · 유일재²

¹산업안전보건연구원 화학물질안전보건센터 · ²한국생활환경시험연구원

Changes of Pulmonary Function and Biopersistence Evaluation of Sepiolite in Sprague-Dawley Rats

Yong Hyun Chung^{†1} · Jeong Hee Han¹ · Jae Hyuck Sung¹ · Il Je Yu²

¹Chemical Safety and Health Research Center, Occupational Safety & Health Research Institute

²Environment & Merchandise Research Institute

Two kinds of sepiolite (sepiolite 1, sepiolite 2), a 500°C heat treated sepiolite (sepiolite 500), and a 700°C heat treated sepiolite (sepiolite 700) were analyzed for their physicochemical properties. After these sepiolites were instilled into rat lungs, the effects of these substances on lung function and biochemical changes were evaluated. In addition, the fibers in the lungs were counted and characterized after the lungs were treated for electron microscopical analysis. The lungs instilled with sepiolites increased their weight and tidal volume statistically significantly compared with the unexposed control. The numbers of lymphocytes and polymorphonuclear cells (PMN) in the bronchoalveolar lavage (BAL) fluid also increased

compared with the control, indicating the sepiolite induced inflammation. The heat treated sepiolites, however, did not show any toxicological differences from the untreated sepiolites. Although sepiolite showed less change in fiber atomic % compositions (sepiolite 500, Si 0.9%, $p < 0.01$; sepiolite 700, Si 3.7%, $p < 0.05$) than chrysotile (Si 9.7%, $p < 0.01$), the durability of the fibers in the lungs could not be determined in this subchronic experiment.

Key Words : sepiolite, BAL, biopersistence, intratracheal instillation

I. 서론

세피오라이트 (sepiolite, CAS NO. 63800-37-3)는 우리말로 해포석으로 알려진 섬유상 물질로 화학식은 $Mg_2Si_2O_8 \cdot 2H_2O$ 이다 (Francine, 등 1985). 천연광물은 산출상태와 결정 화학적 차이 등에 따라 많은 변종이 생길 수 있으며 중국, 스페인 등이 주요 세피오라이트 생산국이다. 세피오라이트는 표면적이 넓고, 흡착력과 결합력이 우수하여 탱크의 청소, 액

상 세제, 접착제, 인쇄용 잉크, 자동차용 광택제, 등의 침전제나 부유제 등으로 사용되고 있다 (Baris 등, 1980). 최근 석면에 대한 관리 및 규제가 강화됨에 따라 세피오라이트가 석면 대체제로서 천장재, 석고보드, 바닥재, 브레이크라이닝, 시멘트 등의 첨가제로 사용되고 있다.

Baris 등 (1980)은 터키의 세피오라이트 광산 근로자들을 대상으로 조사한 결과에 의하면 세피오라이트 섬유소와 관련된 폐질환은 없었다고 하였으나, 최근 세피오라이트 등 석

접수일 : 2006년 8월 1일, 채택일 : 2006년 9월 26일

† 교신저자 : 정용현 ()

면대체재들이 산업계에 널리 사용되고 있고, 물리화학적으로 석면과 유사한 석면대체재들은 폐 섬유화 (pulmonary fibrosis), 폐암 등을 유발할 수 있다는 가능성 때문에 많은 관심을 끌고 있으나 (Morimoto와 Tanaka, 2001), 석면대체재에 대한 안전성을 평가하기 위한 생체내 시험 (in vivo)은 많은 경비, 동물시설이 필요하고, 소요기간이 길다는 단점 때문에 아직까지 완전한 평가가 이루어지지 않은 상태이며, 생체의 시험 (in vitro)은 처음에는 적혈구 등을 이용한 시험이 이루어졌으나, 최근에는 호흡기 세포 배양을 이용한 시험, 분자생물학적 시험 등 메카니즘을 규명하는 연구가 시도되고 있다 (Ishihara, 2001). Ishihara 등 (1997, 1998)이 human alveolar macrophages와 RAW264.7 cells를 이용한 시험결과에 의하면 석면이나 석면대체재에 자극된 폐포 마크로파아지는 TNF- α , IL-1 β 등의 cytokine을 분비하며, 물질의 종류에 따라 cytokine의 농도는 다양하게 나타나고, 각종 whisker 투여군은 대조군에 비하여 LDH 삼출물이 약간 증가하고 TNF- α 농도 변화가 있었으나 whisker 종류 간에는 유의한 차이가 없었다. Tsuda 등 (1998)과 Morimoto 등 (1998)의 시험에서는 whisker를 12개월 동안 흡입시킨 폐에서 mild fibrotic change와 마크로파아지 내 섬유 침식과 IL-1, TNF 등의 증가를 보였다. Zhang 등 (1993)은 석면에 폭로된 폐포 마크로파아지에서 TNF와 IL-6의 분비가 많았다고 하였다. Morimoto 등 (1999)이 4종류의 섬유를 랫드에 4주간 기도주입법으로 투여하고 폐 조직과 폐포 마크로파아지에서 IL-1, TNF, IL-6에 대한 gene expression을 조사한 바에 의하면 높은 섬유증 가능성을 보인 crocidolite 투여군과 whiskers 투여군의 IL-1과 IL-6의 gene expression은 증가되어 이러한 factors들은 폐 조직의 병리적 변화를 평가할 수 있는 biomarker로 판단되었다.

섬유상 물질이 폐에 축적되면, 섬유상 물질의 물리화학적 성질에 따라 염증반응, 섬유화 과정 등을 거쳐 폐암 등 심각한 폐 병변을 유발 할 수 있으며, 폐 섬유화는 축적된 염증세포, 섬유아세포, 결합조직 등이 매트릭스 (matrix)를 형성하여 나타나게 되고, 폐에 축적된 섬유상물질은 폐포 마크로파아지 (alveolar macrophages)의 활성을 유발하며, 폐포 마크로파아지와 실질세포는 TNF (tumor necrosis factor), IL-1 (interleukin-1) 등과 같은 사이토카인 (cytokine)을 분비하고, 이러한 사이토카인은 단백질을 가수분해하는 효소인 프로테아제 (proteinase)를 방출하여 폐 병변을 일으키게 된다 (Morimoto와 Tanaka, 2001).

그동안 세피오라이트에 대한 시험 결과를 살펴보면 독성 정도가 다양하게 나타나고 있다. 유산 생성능을 지표로 한 랫드 복강 내 마크로파아지에 대한 각종 세피오라이트의 세포독성은 백석면과 동등하였지만 (Koshi 등 1969, Sakabe 등 1971, Chamberlain 등 1982), 세포배양액 중에 20% 랫드 혈청

을 첨가한 배양조건에서 실시한 TTC (2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride) 환원능 시험에서는 세포독성이 인정되지 않았다 (Koshi 등 1969, Sakabe 등 1971). 마우스 복강내 마크로파아지에 대한 세피오라이트의 LDH (lactate dehydrogenase) 일탈은 길이가 3 μ m 이하의 세피오라이트에서는 인정되지 않았으나, 5 μ m 이하에서는 백석면과 동등한 정도가 인정되었다 (Chamberlain 등 1982). CHL 세포 (Chinese Hamster Lung cells) 등 배양 세포주에 대한 LDH, lysosome enzyme의 일탈을 지표로 한 세피오라이트의 세포독성은 백석면 보다 약하다고 하였다 (Wright 등, 1980). 본 연구는 4종류의 세피오라이트에 대한 물리 화학적인 특성을 분석하고, 4종류의 세피오라이트를 시험동물의 기도내로 주입하여 시험동물의 폐기능을 평가하고, LDH, NAG, TNF, IL-1 등의 폐내 생화학적인 변화 분석과 전자현미경으로 세피오라이트의 생체 내에서의 섬유소 변화를 분석하여 세피오라이트가 호흡기에 미치는 영향을 평가하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 시험물질

시험물질은 건축자재 첨가제로 사용되고 있는 세피오라이트 1, 세피오라이트 2 그리고 브레이크 라이닝제조 공정 등 산업현장에서 세피오라이트를 열처리 할 때 적용되는 온도인 세피오라이트 1을 1시간 동안 500 $^{\circ}$ C로 가열한 세피오라이트 500, 세피오라이트 1을 1시간 동안 700 $^{\circ}$ C로 가열한 세피오라이트 700를 사용하였으며, 양성대조물질로 사용한 백석면 표준품은 General Science Cooperation (Tokyo, Japan)에서 구입한 UICC (International Union against Cancer) 제품을 사용하였다.

1) 특성 분석을 위한 시료제작

수집한 시료는 Sakai 등(1991)의 시료제작 방법에 따라 각 시료를 막자사발에서 잘게 부수어, 증류수 100 ml가 들어 있는 유리병에 1 mg씩 넣고, 2 시간 동안 초음파발생기 (SWEEPZONE, Quantrex S280)로 분산시킨 후, polycarbonate membrane filter (Millipore GTTP 02500, nuclepore filter, pore size 0.2 μ m, diameter 25 mm)에 흡인 여과하였다. 여과시킨 필터를 건조한 후 진공증착기 (EMITECH, K950)를 사용하여 탄소막을 입히고, 그 필터를 carbon coated nickel grid (SPI 2020N, diameter 3 mm, 200 mesh) 위에 올려놓고 chloroform 증기를 이용하여 12시간 동안 용해, 건조시켰다.

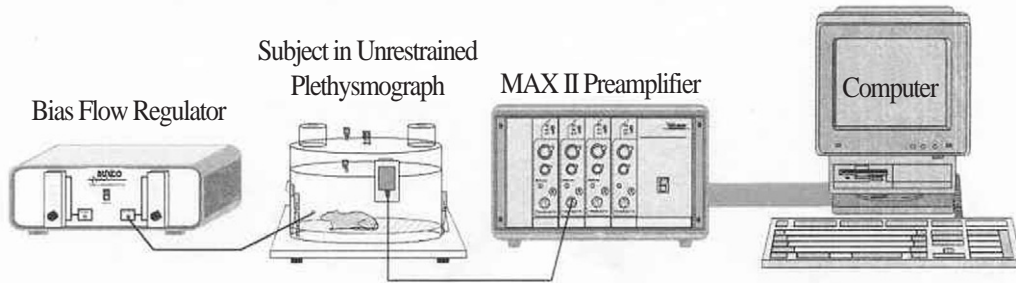


Fig. 1. Typical application of the Bias Flow Regulator - providing air flow a long term measurement of a subject in an Unrestrained Plethysmograph.

2) 석면 및 세피오라이트 분석 방법

제작된 grid는 EDS (Energy Dispersive X-ray Spectrometer, HORIBA, 7099H)가 장착된 투과전자현미경 (HITACHI H-7100FA)을 사용하여 분석하였다. 투과전자현미경의 가속전압은 100 kv로 하였다. 각 시료는 투과전자현미경으로 전반적으로 관찰한 후 10,000배 ~ 5,000 배율에서 길이와 직경의 비율이 3:1이 넘는 10개의 섬유를 임의로 선정하여 섬유의 형태학적 특성을 파악하고, EDS로 각 섬유의 구성원소 성분 비율 (atomic %)을 구하였다.

2. 시험동물 및 사육환경

시험동물은 특정병원체 부재동물 (Specific Pathogen Free, SPF) Sprague-Dawley (SD) Rats 수컷 7주령을 오리엔트(주)에서 분양 받아 barrier system의 동물실에서 12일간 순화시킨 후 건강하고 발육 양호한 동물을 사용하였다. 시험동물은 체중을 지표로 하여 대상군 별로 체중편차가 최소화 되도록 하여, 대조군 10마리, 백석면 투여군 10마리, 세피오라이트 1 투여군 10마리, 세피오라이트 2 투여군 10마리, 세피오라이트 500 투여군 10마리, 세피오라이트 700 투여군 10마리 등으로 군을 구성하였다. 각 군별로 5마리씩은 기관지 폐포 세척 (BAL)용으로 사용하였으며, 나머지 각 군별 5마리씩은 주기적인 폐기능 측정에 사용하였으며 부검 후 폐 장기 검사용으로 사용하였다.

동물사육실은 온도 $22 \pm 3^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 20\%$, 환기회수 13~18회/hr, 조명시간 12시간 (오전9시 ~ 오후 9시) 및 조도 150 ~ 300 Lux로 설정되었으며, 사료는 방사선 멸균된 실험동물용 고형사료 (Labdiet 5002PMI)를 구입하여 자유롭게 섭취시켰다. 물은 미세여과기 및 자외선을 이용하여 여과, 소독된 상수도를 자유로이 섭취시켰다. 모든 동물은 전 시험기간 동안 폴리에틸렌 사육상자에 2 혹은 3마리씩 수용하였다. 시험기간 중 사육상자에는 시험번호 및 동물번호를 기입한

개체식별 라벨을 붙였다.

3. 투여방법

시험물질은 Bellmann 등 (1997)의 방법에 따라 시험물질을 잘게 갈아서 자동 멸균한 후 시험물질의 원활한 주입을 위하여 ketamin (유한양행)으로 마취한 시험동물 한 마리당 2mg/0.3ml in saline 농도로 시험동물의 기도내로 각 시험동물당 1회 주입 (intratracheal instillation) 하였다.

4. 생체변화 평가방법

1) 체중측정 및 임상증상관찰

시험동물에 대한 임상증상관찰은 시험동물 당 시험물질을 1회 투여 후 매일 1회 모든 시험동물에 대해 관찰하였다. 체중측정은 군분리시와 시험물질 투여 후 매 1주마다 4주간 측정하였다.

2) 폐기능 검사

폐기능은 pressure transducer (MAX1320, Buxco Electronics, Sharon, CT)에 의해 서로 연결되어 있는 기준챔버와 시험동물 챔버로 구성되어 있고 일정 유량 (2.0~2.5 lpm)으로 흐르는 whole body plethysmograph (WBP) (SFT3816, Buxco Electronics, Sharon, CT)을 이용하여 측정하였다 (Fig. 1). 시험물질 폭로 전과 폭로 후 매주 1회, 각 시험동물의 1회 호흡량 (tidal volume)을 측정하였다. 각 시험동물은 animal chamber에 넣은 후 40분간의 순화시간을 가진 다음 5분간 측정하였다.

3) 기관지 폐포 세척 및 세포수 측정

기관지 폐포 세척 (BAL, bronchoalveolar lavage)은 시험동물에 시험물질을 1회 투여한 후 30일에 실시하였다. 시험동물

의 마취는 Pentobarbital (Han lim Pharm, Korea)을 이용하였다. 시험동물의 기관지를 절개한 다음 PBS (calcium- and magnesium-free phosphate buffer solution, pH 7.4) 3 ml를 이용하여 시험동물의 폐를 총 4회 세척하였다. 세척액을 500g에서 7분간 원심분리한 후 가라앉은 세포를 취한 다음 1 ml의 PBS 용액에 부유시킨 후 세포수를 측정하였다 (Antonini 등 1996; 1997, Lemaire 와 Ouellet, 1996) 총 세포 수 측정은 hemacytometer (Superior, U.S.A.)에 부유된 세포 1ml 중 20 μ l를 취하여 분석하였다. macrophage, polymorphonucleocytes (PMN), lymphocyte의 분석은 24 well plate에 각각의 샘플에 대해 2장의 커버 슬라이드를 넣은 후 1 ml의 PBS 용액 중 약 400 μ l씩 넣고, 37°C, 5% CO₂ 배양기에 30분 이상 배양하였다. 배양이 끝난 다음 methanol을 이용하여 세포를 고정하고, macrophage 특이 염색인 α -naphthyl acetate esterase (sigma, ST. LOUIS, MO 63178, USA) 염색과 Wright-Giemsa Sure 염색을 하여 400 배율 광학현미경으로 각 샘플당 200개의 세포에서 과립백혈구 (PMN) 및 lymphocyte의 수의 비율을 측정하여 총 세포 수에 곱한 값을 각 세포의 수로 하였다 (Adamson 등, 1995).

4) BAL 생화학측정

원심 분리한 기관지 폐포 세척액의 상층액을 이용하여 IL (interleukin-1 β), TNF (tumor necrosis factor- α) 등의 cytokine과 LDH (lactic dehydrogenase), NAG (β -n-acetyl glucosaminidase) 등에 대한 생화학검사를 실시하였다. LDH, NAG 등은 자동생화학분석기 (TBA 20 FR, Japan)를 사용하였으며, IL-1 β , TNF- α 등의 inflammatory cytokine은 BAL내의 단백질을 측정하여 1 mg이 되도록 한 후에 TNF- α 는 rat TNF ELISA kit II (BD OptEIA™, BD biosciences, USA)를 이용하였으며, IL-1 β 는 rat IL-1 β immunoassay kit (Quantikine® M, R&D, USA)를 이용하여 측정하였다 (Srivastava 등, 2002; Antonini 등, 1997).

5) 폐 장기무게 측정

시험동물은 pentobarbital (Han lim Pharm, Korea)을 사용하여 시험동물을 마취시켜 복대동맥에서 채혈한 후 시험동물의 폐 장기무게를 측정하였다.

6) 폐내 fiber 분석

10% 중성포르마린에 고정시킨 왼쪽 폐조직을 공기 중에서 건조시킨 뒤 dry oven에서 하룻밤 건조시킨 다음, 폐무게를 측정한 후 저온회화로 (Low Temperature Plasma Asher, Yamato, Japan)에 산소를 공급하면서 하룻밤 회화시켰다. 회화된 폐조직은 Fiber free 증류수에 녹여 nucleopore filter

(Millipore GTTP 02500, pore size 0.2 μ m, diameter 25 mm)에 여과하고, 필터를 건조한 후 진공증착기 (EMITECH, K950)를 사용하여 탄소막을 입히고, 그 필터를 carbon coated nickel grid (SPI 2020N, diameter 3 mm, 200 mesh) 위에 올려놓고 chloroform 증기를 이용하여 12시간 동안 용해, 건조시켜 고정한 후 폐내 fiber 측정을 위한 시료로 사용하였다. 시험동물에 시험물질을 주입하기 전의 시험물질 분석방법과 같은 조건으로 투과 전자현미경과 EDS를 이용하여 각 동물의 폐 시료에서 10개의 fiber를 선정하여 각 fiber의 성분을 분석하였다.

5. 통계처리

시험물질 분석, 체중, 폐기능 검사, 세포수, 생화학검사, 폐무게 등의 시험결과는 평균과 표준편차로 표시하였으며, 일원배치분산분석 (one-way ANOVA)에서 유의성이 인정된 자료는 Dunnett 다중비교법을 이용하여 유의성을 검정하였다. 폐내 fiber 분석은 t-test로 유의성을 검정하였다.

III. 연구결과


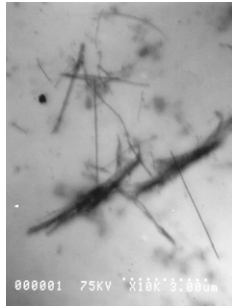

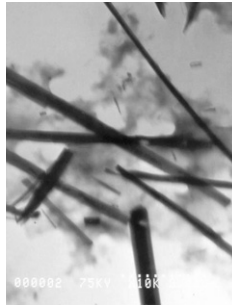

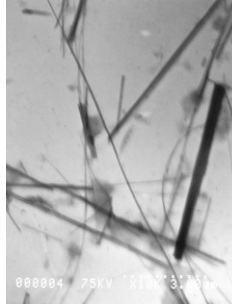
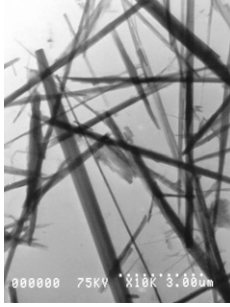

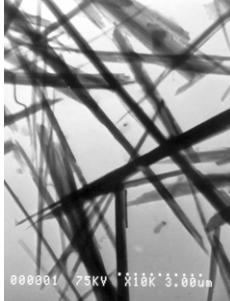

1. 시험물질의 형태와 원소구성비

투과전자현미경과 EDS를 이용하여 시험물질의 형태를 살펴보고 원소구성비를 측정하였다 (table 1, 5). sepiolite 1은 백석면에 비하여 직경이 굵은 모양을 보였으며 백석면에서는 측정되지 않는 Ca (10.3%)과 Na (2.0%)이 나타났다. sepiolite 2는 직경이 다른 2가지 종류의 섬유가 혼재되어 있었으며, 상대적으로 직경이 굵은 형태의 type II에서는 type I에서는 나타나지 않는 Ca (11.2%)과 Na (1.0%), K (0.6%)이 측정되었다. sepiolite 500은 sepiolite 1과 형태와 원소구성비가 비슷하였으며, sepiolite 700은 sepiolite 1과 형태와 원소구성비가 비슷하였으나, sepiolite 1에서 나타났던 Na는 측정되지 않았다.

2. 체중 변화 및 임상증상 관찰

모든 시험동물은 시험기간 중 특이한 임상증상은 관찰되지 않았다. 체중 변화는 시험물질 투여 후 7일차에서 모든 시험물질 투여군은 대조군에 비하여 유의한 체중감소를 보였으며 ($p < 0.01$), sepiolite 1 투여군은 백석면과 다른 sepiolite 투여군에 비하여도 유의한 체중감소를 보였다 ($p < 0.01$). 투여 후 14일에서는 sepiolite 1 투여군이 대조군에 비하여 유의한

Table 1. STEM image of fibers

Material (Magnification)	before instillation	30 days after instillation
Chrysotile ($\times 10,000$)		
Sepiolite 1 ($\times 10,000$)		
Sepiolite 2 ($\times 10,000$)		
Sepiolite 500 ($\times 10,000$)		
Sepiolite 700 ($\times 10,000$)		

체중감소를 보였다 ($p < 0.01$). 투여 후 21일과 28일에서는 모든 시험물질 투여군에서 대조군에 비하여 유의한 변화는 없었다 (fig. 2).

3. 폐 기능검사

시험물질 투여 후 시험동물의 폐기능의 변화를 알아보기 위하여 1회 호흡량 (tidal volume)을 측정한 결과, 투여 후 28일차에서는 7일차, 14일차, 21일차에 비하여 백석면군, sepiolite 1군, sepiolite 2군, sepiolite 500군, sepiolite 700군 등 모든 시험물질 투여군의 1회 호흡량이 유의한 증가를 보였다 ($p < 0.01$). 시험물질별로 살펴보면, 백석면군과 sepiolite 1군은 투여 후 7일차에서는 대조군에 비하여 유의한 감소를 보였으나 ($p < 0.01$), 투여 후 28일차에서는 대조군에 비하여 유의한 증가를 보였다 ($p < 0.01$). sepiolite 2군은 7일차와 28일차에서 대조군에 비하여 유의한 증가를 보였다 ($p < 0.01$). sepiolite 500군은 14일차의 백석면군과 21일차의 sepiolite 2군에 비하여 유의한 증가를 보였고 ($p < 0.01$), 28일차에서는 대조군, 백석면군, sepiolite 1군, sepiolite 2군에 비하여 유의한 증가를 보였다 ($p < 0.01$). sepiolite 700군은 투여 후 7일차, 14일차, 21일차, 28일차 등에서 다른 모든 시험군에 비하여 유의한 증가를 보였다 ($p < 0.01$) (fig. 3).

4. BAL 시험

1) 세포수 측정

시험물질 투여 후 30일에 시험동물을 희생하여 BAL 용액 내의 세포변화를 살펴본 결과, polymorphonuclear cell과 lymphocyte는 증가하는 경향을 보였으나, 통계적 유의성은 lymphocyte가 sepiolite 2군에서만 대조군에 비하여 유의한 증가를 보였다 ($p < 0.01$). macrophage는 유의한 변화가 없었다 (table 2).

2) 생화학검사

시험동물의 폐병변의 정도를 평가하기 위하여 시험물질 투여 후 30일에 시험동물을 희생하여 BAL 용액 내의 LDH, NAG, IL, TNF 등에 대한 생화학적 변화를 살펴본 결과, 대조군에 비하여 유의한 변화가 없었다 (table 3).

5. 폐 장기 무게측정

시험물질 투여 후 30일에 시험동물을 해부하여 폐무게를 측정한 결과, 대조군에 비하여 백석면군, sepiolite 1군, sepiolite 2군, sepiolite 500군, sepiolite 700군 등 모든 시험물질 투여군에서 절대 폐무게의 유의한 증가를 보였으며 ($p < 0.01$), 체중에 대한 장기무게의 비율로 계산한 상대 폐무게에서도 대조군에 비하여 모든 시험물질 투여군에서 유의한 증가를 보였다 ($p < 0.01$) (table 4).

6. 폐 조직 내 시험물질의 형태 및 구성원소비 변화

시험동물의 폐 내에서 시험물질의 시간 경과별 변화와 생체내구성을 비교하기 위하여 시험동물에 투여하기 전의 시험물질과 시험물질을 시험동물의 기관내로 1회 투여하고 30일 후에 시험동물을 해부하여 폐 내에서의 세피오라이트의 종류별로 섬유 크기와 구성성분비 (atomic %) 변화를 전자현미경과 EDS를 이용하여 비교 분석한 결과 (table 1, 5), 각 시험물질에 공통으로 들어 있는 Si 구성성분비 (atomic %) 변화는 백석면 투여군에서 40.7%에서 49.0%로 변화하여 8.3% 변화율을 보였으나 ($p < 0.01$), sepiolite 1 투여군에서는 Si는 유의한 변화가 없었다. Sepiolite 2 (type I) 투여군과 sepiolite 2 (type II) 투여군에서도 유의한 Si 변화는 없었다. Sepiolite 500 투여군에서는 Si가 54.8%에서 53.9%로 유의하게 감소하여 0.9%의 변화율을 보였고 ($p < 0.05$), sepiolite 700 투여군에서는 Si가 51.8%에서 55.5%로 유의하게 증가하여 3.7% 변화율을 보였다 ($p < 0.01$) (table 5). 백석면과 4종의 sepiolite 등 모든 시험물질의 생체 폐 내에서 섬유 크기는 뚜렷한 변화를 볼 수 없었다 (table 1).

IV. 고찰

본 연구를 위하여 세피오라이트 시험물질을 수집해 분석해 본 결과, 우리나라에서 사용되고 있는 세피오라이트는 주로 중국에서 수입되고 있으며, 중국산 세피오라이트는 산지에 따라 섬유 길이가 긴 것과 짧은 것 그리고 세피오라이트에 백석면이 섞여 있는 것 등 세피오라이트의 생성과정 및 산지에 따라 다양한 형태를 보이고 있었다. 본 연구에 사용된 시험물질을 분석한 결과, 세피오라이트 1, 세피오라이트 500, 세피오라이트 700은 백석면보다 형태가 크고, 원소구성비는 백석면의 주성분인 Mg와 Si의 구성비와는 반대로 나타났다. 세피오라이트 2의 경우는 대부분 백석면과 유사한 크기로 보이는 가는 섬유 (type I) 모양이었지만 주요 구성성분비는 백석면과 달랐고, 세피오라이트 1과 유사한 모양과

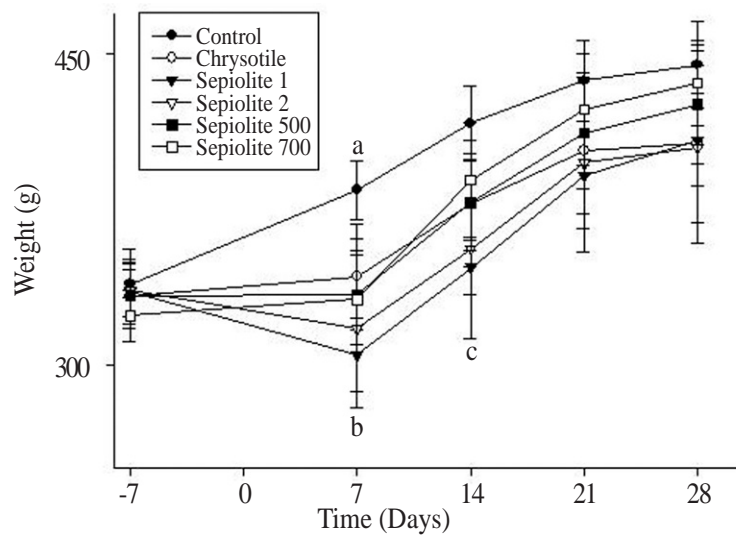


Fig. 2. Body weight change of SD male rats after instillation.

a : $p < 0.01$ (control vs. other groups in 7 days)

b : $p < 0.01$ (sepiolite 1 vs. chrysotile and other sepiolite groups in 7 days)

c : $p < 0.01$ (sepiolite 1 vs. control in 14 days)

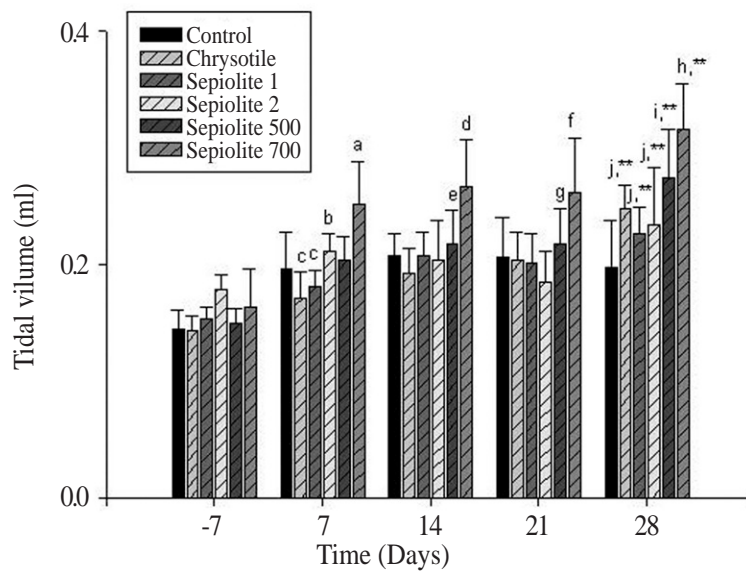


Fig. 3. Tidal volume change in lung function test after instillation.

a : $p < 0.01$ (sepiolite 700 vs. other groups in 7 days)

b : $p < 0.01$ (sepiolite 2 vs. control and sepiolite 1 and chrysotile in 7 days)

c : $p < 0.01$ (control vs. sepiolite 1 and chrysotile in 7 days)

d : $p < 0.01$ (sepiolite 700 vs. other groups in 14 days)

e : $p < 0.01$ (sepiolite 500 vs. chrysotile in 14 days)

f : $p < 0.01$ (sepiolite 700 vs. other groups in 21 days)

g : $p < 0.01$ (sepiolite 500 vs. sepiolite 2 in 21 days)

h : $p < 0.01$ (sepiolite 700 vs. other groups in 28 days)

i : $p < 0.01$ (sepiolite 500 vs. control and chrysotile and sepiolite 1 and sepiolite 2 in 28 days)

j : $p < 0.01$ (control vs. chrysotile and sepiolite 1 and sepiolite 2 in 28 days)

** : $p < 0.01$ (28 days vs. other days)

Table 2. Cell counts results in BAL of SD male rats of 30 days after instillation

Items	Control	Chrysotile	Sepiolite 1	Sepiolite 2	Sepiolite 500	Sepiolite 700
Total cell	2.94 ± 2.01	2.34 ± 1.48	3.08 ± 1.24	3.00 ± 1.25	2.57 ± 0.94	2.61 ± 0.46
MA	2.70 ± 1.85	1.95 ± 1.23	2.34 ± 0.94	2.22 ± 0.93	1.94 ± 0.71	2.10 ± 0.37
PMN	0.18 ± 0.12	0.26 ± 0.16	0.34 ± 0.14	0.27 ± 0.11	0.29 ± 0.11	0.25 ± 0.04
LY	0.06 ± 0.04	0.26 ± 0.16	0.40 ± 0.16	0.54 ± 0.23**	0.33 ± 0.12	0.26 ± 0.05

All values are expressed as mean ± SD

Significant differences as compared with control : ** p < 0.01

Total cell, (10³/mm³); MA, macrophage (10³/mm³); PMN, polymorphonuclear cell (10³/mm³); LY, lymphocyte (10³/mm³)

Table 3. Biochemistry and cytokine assay results in BAL of SD male rats of 30 days after instillation

Items	Control	Chrysotile	Sepiolite 1	Sepiolite 2	Sepiolite 500	Sepiolite 700
LDH	3.68 ± 3.91	1.59 ± 1.35	5.84 ± 8.09	2.14 ± 1.11	1.25 ± 0.92	4.45 ± 4.55
NAG	0.77 ± 0.70	0.93 ± 0.28	1.37 ± 0.64	0.56 ± 0.36	0.62 ± 0.31	1.04 ± 0.99
L	25.70 ± 1.23	24.44 ± 0.36	24.79 ± 0.14	25.19 ± 1.26	28.00 ± 4.32	28.10 ± 6.11
TNF	53.58 ± 3.53	57.78 ± 7.45	54.88 ± 8.39	58.25 ± 7.69	51.01 ± 6.92	49.16 ± 18.35

All values are expressed as mean ± SD

Significant differences as compared with control : * p < 0.05

LDH, lactic dehydrogenase (IU/L); NAG, β-n-acetyl glucosaminidase (IU/L); IL, interleukin-1β (pg/mg); TNF, tumor necrosis factor-α (pg/mg)

Table 4. Lung weight of SD male rats of 30days after instillation

		Absolute lung weight (unit : mg)	Relative lung weight (unit : %)
Control	Left	470.0 ± 28.3	0.113 ± 0.007
	Right	1007.6 ± 33.89	0.243 ± 0.012
Chrysotile	Left	579.2 ± 21.44**	0.139 ± 0.007**
	Right	1216.0 ± 101.74**	0.292 ± 0.025**
Sepiolite 1	Left	750.4 ± 78.13**	0.199 ± 0.018**
	Right	1601.2 ± 126.42**	0.424 ± 0.029**
Sepiolite 2	Left	717.2 ± 89.01**	0.177 ± 0.033**
	Right	1458.0 ± 133.64**	0.359 ± 0.056**
Sepiolite 500	Left	729.4 ± 59.50**	0.182 ± 0.035**
	Right	1463.8 ± 134.14**	0.365 ± 0.067**
Sepiolite 700	Left	684.0 ± 79.75**	0.171 ± 0.027**
	Right	1403.8 ± 130.14**	0.351 ± 0.054**

All values are expressed as mean ± SD

Significant differences as compared with control : ** p < 0.01

구성성분비를 보이는 섬유 (type II)도 함유되어 있었다.

Hori 등 (1994)이 길이가 다른 whisker를 랫드에 주입시켜 생체내구성을 측정한 시험결과에 의하면, whisker 섬유는 크기 (size)보다 섬유의 생체내구성이 더 중요한 요소임을 보여 주었다. 유리섬유를 랫드에 폭로시킨 후 랫드의 폐 내에서의 생물학적 반감기를 조사한 결과, 20 μ m 이상의 유리섬유는 반감기가 1.4개월이었으나, 크기분포 (size distribution)는 변화가 없었고 (Ishimatsu 등, 1998), 내화세라믹 (refractory ceramic fiber)을 랫드에 2주간 폭로한 후 희생시켜 각 제거시간 (clearance time) 별로 주사현미경으로 관찰한 결과에서도 내화세라믹 섬유 수와 평균 길이는 유의한 차이를 보이지 않았으나, 직경은 감소하였으며, 섬유 표면은 부식되어 있었다 (Yamato 등 1992; Yamato 등 1994). 본 연구에서는 각 시험물질을 시험동물의 기관내로 1회 투여하고 4주 후에 시험동물을 해부하여 폐 내에서의 섬유의 크기 및 성분 변화를 전자현미경과 EDS로 분석한 결과, 구성성분비 (atomic %)는 백석면 투여군에서는 Mg와 Si가 큰 변화를 보였으나, 세피오라이트 1, 세피오라이트 2, 세피오라이트 500와 세피오라이트 700에서는 변화는 적었다. 섬유소의 생체내구성을 구성성분비의 변화를 기준으로 볼 때 세피오라이트는 백석면보다 생체내구성이 강하다고 판단되었지만, 백석면과 4종의 세피오라이트 등 모든 시험물질의 크기 (size)는 생체 폐 내에서 뚜렷한 변화를 볼 수 없었다.

Ishihara (2001)는 각종 whisker 섬유에 의한 TNF- α 의 생산은 마크로파지 세포에 통합된 whisker 섬유의 수와 관계가 있지만, whisker 종류별로 TNF- α 농도의 변화는 거의 없었고,

화학적인 구성성분의 차이와 중량당 섬유의 수적인 차이 및 형태의 차이는 whisker를 투여한 랫드의 폐 섬유화와 염증 정도에는 영향을 미치지 않는 것으로 판단하였다. 본 연구에서는 형태가 다른 세피오라이트를 종류별로 시험동물에 투여하여 시험동물의 생체반응을 조사하였지만, 시험동물의 폐 무게, BAL 측정, 폐기능검사, 폐조직내 섬유상검사 등에서 세피오라이트 종류에 따른 뚜렷한 차이를 보이지는 않았다. Porter 등 (2004)은 실리카 흡입시험 결과에서 폐무게의 증가는 실리카 흡입에 따른 염증세포의 유입과 부종, collagen 축적으로 인한 것으로 판단하였다. 본 연구에서도 모든 시험물질 투여군에서 유의한 폐무게의 증가가 관찰되었다.

폐에 축적된 섬유상물질은 폐포 마크로파지의 활성을 유발하며, 폐포 마크로파지는 TNF, IL-1 등과 같은 사이토카인을 분비하며 (Morimoto 와 Tanaka, 2001), TNF와 IL-1은 염증반응의 매개체, 면역자극제 기능을 하게 된다 (Vilcek 와 Lee, 1991). LDH는 폐에서 세포막이 손상되면 나타나는 지표이며, NAG는 라이소솜 효소로서 탐식세포 (phagocytic cells)의 활성을 의미한다 (Stephen 등, 2002). Porter 등 (2004)이 랫드에 실리카를 폭로한 후 희생시킨 폭로군과 폭로 후 36일간 회복기를 둔 후 희생시킨 군에 대한 시험 결과에 의하면, 기관지폐포를 세척하여 과립백혈구 PMN, LDH, albumin을 측정한 결과에서 모든 폭로군은 대조군에 비하여 유의하게 증가하였으며, 각 폭로군 간의 폐무게, PMN, LDH, albumin도 폭로농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였으나, 본 연구에서는 시험동물의 BAL 용액을 이용하여 IL, TNF, LDH, NAG 등에 대한 변화를 검사하였으나 대조군에 비하여

Table 5. Change of EDS atomic % from lung of SD male rats of 30 days after instillation

		Na	Mg	Si	K	Ca	Fe
Chrysotile	before		58.2 \pm 1.10	40.7 \pm 1.07			1.2 \pm 0.8
	after		49.4 \pm 2.49**	49.0 \pm 3.08**			1.6 \pm 0.92
Sepiolite 1	before	2.0 \pm 1.76	32.8 \pm 1.09	53.5 \pm 1.21	10.3 \pm 1.21	10.3 \pm 1.21	1.4 \pm 0.63
	after	2.7 \pm 1.25	31.4 \pm 1.55**	54.2 \pm 1.36	10.0 \pm 0.87	10.0 \pm 0.87	1.6 \pm 1.13
Sepiolite 2 type I	before		39.6 \pm 0.72	60.4 \pm 0.72			
	after		38.2 \pm 2.03	61.8 \pm 2.03			
Sepiolite 2 type II	before	1.0 \pm 1.02	33.3 \pm 0.21	53.9 \pm 1.48	0.6 \pm 0.54	11.2 \pm 0.95	
	after	1.7 \pm 0.79	33.1 \pm 0.80	54.1 \pm 0.82	0.6 \pm 0.32	10.5 \pm 0.65*	
Sepiolite 500	before	1.9 \pm 0.83	32.2 \pm 0.99	54.8 \pm 0.90	9.5 \pm 1.11	9.9 \pm 0.86	1.7 \pm 0.37
	after	2.7 \pm 1.01*	32.1 \pm 1.32	53.9 \pm 1.30*	9.9 \pm 0.86	9.9 \pm 0.86	1.5 \pm 0.62
Sepiolite 700	before		32.8 \pm 1.55	51.8 \pm 9.58	10.5 \pm 0.811	10.5 \pm 0.81	1.9 \pm 0.55
	after		32.7 \pm 1.24	55.5 \pm 1.24**	10.1 \pm 0.97	10.1 \pm 0.97	1.8 \pm 0.81

All values are expressed as mean \pm SD

Significant differences as compared with test substance before instillation : ** p < 0.01, * p < 0.05

유의한 변화가 없었으며, BAL 용액 내에서의 세포수 변화를 관찰한 결과, 대조군에 비하여 폭로군의 마크로파아지는 변화가 없었고, polymorphonuclear cell과 lymphocyte는 대조군에 비하여 다소 증가하는 경향을 보였다.

호흡기계의 질병 부위와 병변의 정도에 따라 폐기능 검사 결과는 다양하게 나타날 수 있다. 호흡곤란 남성의 폐기능 검사에서 1회 호흡량과 분당 호흡량이 감소하였지만 (Brack 등, 2002), 폐병변을 유발하는 bleomycine을 14일간 기도내로 점적 주입시킨 Wistar 랫드에서는 대조군에 비해 1회 호흡량은 감소하고, 호흡횟수는 증가하였고 (Mansoor 등, 1997), acid anhydrides, diisocyanates, reactive dye 등에 폭로된 Brown Norway 랫드에서는 1회 호흡량, 호흡횟수가 대조군에 비하여 감소하였다 (Arts 등, 2003). 본 연구에서 시험물질이 시험동물의 폐기능에 미치는 영향을 평가하기 위하여 시험물질을 투여한 후 28일차에 1회 호흡량 (tidal volume)을 검사한 결과, 모든 시험물질 투여군에서 1회 호흡량이 대조군에 비하여 유의한 증가를 보여 시험물질은 시험동물의 폐기능에 영향을 미친 것으로 판단되었으며, 이러한 1회 호흡량의 증가는 폐포의 산소교환 등 폐조직의 생체 보상작용에 따른 반응으로 판단되었다.

V. 결론

세피오라이트는 대조군에 비하여 유의한 폐무게 증가, 1회 호흡량 증가 그리고 polymorphonuclear cell과 lymphocyte가 증가하는 경향을 보여 주어 세피오라이트가 폐에 염증반응을 일으키는 물질로 판단되었으나, 세피오라이트의 열처리 및 종류에 따른 독성 정도의 차이는 뚜렷하지 않았다. 세피오라이트를 랫드의 폐내에 주입하여 세피오라이트의 변화를 분석한 결과, 세피오라이트의 크기와 수의 변화는 거의 없었으나, 각 시험물질에 공통으로 들어 있는 Si 구성성분비 (atomic %) 변화는 백석면 투여군에서 40.7%에서 49.0%로 변화하여 8.3%변화율을 보였으나, sepiolite 1 투여군과 Sepiolite 2 투여군에서는 유의한 Si 변화는 없었다. Sepiolite 500 투여군에서는 Si가 54.8%에서 53.9%로 유의하게 감소하여 0.9%의 변화율을 보였고, sepiolite 700투여군에서는 Si가 51.8%에서 55.5%로 유의하게 증가하여 3.7% 변화율을 보였다 이러한 결과로 보아 세피오라이트는 백석면보다 생체내에서 변화율이 적어 생체내구성이 강할 수 있는 가능성을 보였으나 본 연구는 세피오라이트를 1회 기도내로 주입하여 1개월 후에 생체내구성을 분석한 결과이므로 정확한 생체내구성을 평가하기 위해서는 시험물질을 주입한 후 더욱 장기적인 기간을 유지한 시험이 필요하다고 판단된다.

REFERENCES

- Arts JHE, Bloksma N, Leusink-Muis T and Kuper CF. Respiratory allergy and pulmonary irritation to trimellitic anhydride in Brown Norway rats. *Toxicol Appl Pharm* 2003; 187: 38-49.
- Bellmann B, Muhle H, Kamstrup O, Graeger UF. Investigation of the biodegradability of man made vitreous fibers in rat lungs. *Environ Health perspect* 1997; 102(suppl 5): 185-189.
- Baris YI, Sahin AA and Erkan ML. Clinical and radiological study in sepiolite workers. *Archives of Environmental Health* 1980; 35(6): 343-346.
- Brack T, Jubran A and Tobin MJ. Dyspnea and decreased variability of breathing in patients with restrictive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 1260-1264.
- Chamberlain M, Davies R, Brown RC and Griffiths DM. In vitro test for the pathogenicity of mineral dusts. *Ann Occup Hyg* 1982; 26: 583-592.
- Fancine Denizeau, Michel Marine, Gaston Chevalier and Michel G Cote. Absence of genotoxic effects of nonasbestos mineral fibers. *Cell Biology and Toxicology* 1985; 1: 23-32.
- Hori H, Kasai T, Haratake J, Ishimatsu S, Oyabu T, Yamato H, Higashi T, Tanaka I. Biological effects of inhaled magnesium sulphate whiskers in rats. *Occup Environ Med* 1994; 51: 492-9.
- Ishihara Y. In vitro studies on biological effects on fibrous minerals. *Industrial Health* 2001; 39: 94-105.
- Ishihara Y, Kohyama N, Nagai A, Kagawa J. Contribution of human pulmonary macrophage-derived cytokines to asbestos-induced lung inflammation and fibrosis. *Inhal Toxicol* 1997; 10: 205-25.
- Ishihara Y, Kohyama N, Nagai A, Kagawa J. Cellular biological effects and a single transtracheal injection test in three types of whisker fibers. *Inhal Toxicol* 1998; 10: 275-91.
- Koshi K, Hayashi H and Sakabe H. Cell toxicity and hemolytic action of asbestos dust. *Ind Health* 1969; 6: 69-79.
- Mansoor JK, Hyde DM and Schelegle ES. Contribution of vagal afferents to breathing pattern in rats with lung fibrosis. *Res Physiol* 1997; 108: 45-61.
- Morimoto Y and Tanaka I. In vivo studies of man made mineral fibers - fibrosis related factors -. *Industrial Health* 2001; 39: 106-113.
- Morimoto Y, Tsuda T, Yamato H, Hori H, Higashi T, Tanaka I. Risk assessment of man made fibers by RT-PCR. In: *Advances in the prevention of occupational respiratory disease*. ed. Chiyotani K, Hosoda Y, Aizawa Y, Elsevier Science, Amsterdam; 1998. p. 611-4,

- Morimoto Y, Tsuda T, Hirohashi M, Yamato H, Hori H, Ohgami A, Yatera K, Kim HN, Ding L, Kido M, Higashi T, Tanaka I. Effects of mineral fibers on the gene expression of proinflammatory cytokines and inducible nitric-oxide synthase in alveolar macrophages. *Ind Health* 1999; 37: 329-34.
- Porter D, Hubbs AF, Mercer R, Robinson VA, Ramsey D, McLaurin J, Khan A, Battelli L, Brumbaugh K, Teass A and Castranova V. Progression of lung inflammation and damage in rats after cessation of silica inhalation. *Toxicological science* 2004; 79: 370-380.
- Sakabe H, Koshi K and Hayashi H, On the cell toxicity of mineral dusts. *Inhaled Particles III*. ed. Walton, W. H., Unwin Brothers Limited; 1971. p. 423-434.
- Sakai K, Hisanaga N, Kojima A, and Takeuchi Y, Elemental composition of asbestos fibers recovered from human lung. *Annual Report of Nagoya City Public Health Research Institute* 1991; 37: 116-119.
- Stephen S. Leonard, Kristina Mowrey, Donna Pack, Xianglin Shi, Vince Castranova, Periannan Kuppusamy and Val Vallyathan. In vivo bioassays of acute asbestosis and its correlation with ESR spectroscopy and imaging in redox status, *Molecular and Cellular Biochemistry* 2002; 234/235: 369-377.
- Tsuda T, Yamato H, Morimoto Y, Oyabu T, Ishimatsu S, Hori H, Kasai T, Kido M, Higashi T, Tanaka I. One year inhalation study of man made fibers, In: *Advances in the prevention of occupational respiratory disease*. eds, by Chiyotani K, Hosoda Y, Aizawa Y Elsevier Science. Amsterdam; 1998. p. 596-600.
- Vilcek J, Lee TH. Tumor necrosis factor: New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *J Biol Chem* 1991; 266: 7313-6.
- Wright A, Gormley IP, Collings PL and Davis MG. The cytotoxicities of asbestos and other fibrous dusts, In : *In vitro effects of mineral dusts* (Edited by Brown R. C., et al.) Academic Press; 1980. p 25-31.
- Yamato H, Tanaka I, Higashi T, Kido M. Determinant factor for clearance of ceramic fibers from rat lungs. *Br J Ind Med* 1992; 49: 182-5.
- Yamato H, Tanaka I, Higashi T, Kido M. Clearance of inhaled ceramic fibers from rat lungs. *Environ Health Perspect* 1994; 102(suppl 5): 169-71.
- Zhang Y, Lee TC, Guillemin B, Yu M-C, Rom WN. Enhance IL-beta and tumor necrosis factor- release and messenger RNA expression in macrophages from idiopathic pulmonary fibrosis or after asbestos exposure. *J Immunol* 1993; 150: 4188-96.