

랫드에 주입된 국내산 암면의 호흡기 독성 및 생체내구성 평가

정용현[†] · 한정희 · 강민구 · 이성배 · 김현영

산업안전보건연구원 화학물질안전보건센터

Domestic Rock Wool Toxicity Study on Respiratory System and Biopersistence Evaluation in Sprague-Dawely Rats

Yong Hyun Chung[†] · Jeong Hee Han · Min Gu Kang · Sung Bae Lee · Hyeon Yeong Kim

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

Rock wool, a kind of asbestos substitutes, was analyzed for its physicochemical properties. After fivers of rock wool were instilled into rat lungs, These pathological 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 of rats showed pathological lesions such as granulomatous changes, but these lesions disappeared at 28 days groups after instilled rats. The rock wool fibers in the lungs decreased more 50 % after 28 days instilled into rat lungs. And rock wool showed early change in fiber compositions after 3 days compare with chrysotile showed after

7 days instilled into rat lungs. This study showed that the durability of rock wool in the lungs is more milder than chrysotile.

Key Words : Rock wool, rat, biopersistence, intratracheal instillation, TEM-EDS

I . 서 론

암면 (rock wool)은 천장재나 내화용 뿔칠재로 사용되는 대표적인 석면대체재로서 규소, 칼슘, 마그네슘, 알루미늄, 철 등으로 구성되어 있는 인조유리섬유 (synthetic vitreous fibers, SVFs)이다 (Foa 등, 1999). 최근 석면에 대한 규제 강화로 물리 화학적으로 석면과 유사한 석면대체재들의 사용량이 늘고 있으며, 석면대체재도 폐 섬유화, 폐암 등을 유발할 수 있다는 가능성 때문에 많은 관심을 끌고 있으나, 석면대체재에 대한 안전성은 아직 완전한 평가가 이루어 지지 않은 상태이

다 (Morimoto와 Tanaka, 2001). 일반적으로 인조유리섬유는 물리적 화학적 특성상 석면보다는 안전한 물질로 알려져 있지만 (Lee 등 1979, Tilkes 등 1983), 길고 얇은 섬유가 오래 동안 폐 속에 남아 있으면 폐 손상, 섬유화, 폐암 등을 유발할 수 있다고 주장한 바 있다 (Shibata 등 2007). Warheit (2001) 등에 의하면 인조유리섬유가 폐에 미치는 영향은 폐 내에 축적된 섬유량과 직접적으로 관련이 있으며, 가는 섬유는 폐에 축적되기 쉽고 폐 내의 생체내구성 (biopersistence)은 섬유의 길이와 용해도 그리고 섬유의 절단율과 관련이 있다고 하였다. Plato (1990) 등이 1978년 이전에 최소한 1년 이상 인조유리섬

접수일 : 2009년 1월 6일, 채택일 : 2009년 5월 6일

[†] 교신저자 : 정용현(대전시 유성구 문지동 104-8번지 산업안전보건연구원 ,
Tel : 042-869-0344, Fax : 042-863-9001, E-mail : ch935@kosha.net)

유(암면, 유리면) 제조업에 종사했던 근로자들에 대한 추적 조사결과에 의하면 인조유리섬유 폭로와 폐암이나 위암과의 관련성은 찾을 수 없었으며, De Vuyst (1995)등도 유리면, 암면 등에 폭로된 사람에서 호흡기 질환에 이환된 뚜렷한 증거는 없다고 하였다. IARC (2002)는 Volume 81 (man-made vitreous fibers)에서 인조유리섬유에 대한 그동안의 역학조사 결과와 동물실험결과 등을 재평가하여 암면 (rock wool, slag wool)과 유리면 (insulation glass wool, continuous glass filament)을 group 2B (possible carcinogenic to humans)에서 group 3 (not classifiable as to carcinogenicity to humans)로 재분류하였으며, 내화세라믹섬유와 특수유리섬유 (special-purpose glass fibers)에 대하여는 group 2B로 분류한 바 있다. 호흡기로 흡입된 섬유는 호흡기관내에서 충돌, 침강, 차단 등 공기역학적 행동 (aerodynamic behavior)과 브라운 운동 (Brownian motion)에 의한 확산 이동에 의하여 호흡기내에 축적되며, 호흡기 내로 축적된 섬유의 지속력은 섬유의 화학적 구성성분, 섬유의 크기, 축적된 섬유량에 영향을 받으며, 생체 내에서 섬유의 제거는 비인두, 기관과 기관지에서서의 점액과 섬모세포에 의한 점액섬모운동과 폐포 영역에서는 macrophage의 탐식에 의하여 주로 일어나지만, 섬유의 길이가 20 μ m 이상의 경우에는 macrophage의 탐식작용은 완전하지 않으며, 폐 내의 섬유에 대한 macrophage의 탐식작용과 화학적 용해와 여과 그리고 분절작용 등으로 이루어지는 사람의 폐포 내 인조유리섬유의 반감기 (retention half-time)는 수 백일로 알려져 있다 (IARC, 2002). Boilat (1999)에 의하면 실험동물의 체강내로 투여한 인조유리섬유가 폐종양과 중피종을 유발 할 수는 있지만, 체강 내로 투여한 동물실험 결과는 인조광물섬유의 흡입, 축적, 청소, 운반 메카니즘이 사람의 호흡과정과는 다르므로 인조광물섬유를 체강내로 투여한 동물실험 결과를 사람에게 직접 외삽시키기는 어려우며, 인조광물섬유를 실험동물의 호흡기로 폭로시킨 흡입시험 결과는 실험동물 종간에 민감성이 차이가 나지만, 최근 Topinka 등이 (2006) 암면 (RW1)이나 유리면 (MMVF10)을 F344 랫드 한 마리당 1 mg 혹은 2 mg를 기도 내로 단회 주입한 후 16주간 관찰한 시험결과와 주 1회 한 마리당 2 mg를 4주간 연속 (총 8 mg) 주입한 후 16주간 관찰한 시험결과에 의하면, 시험동물의 폐에서 MMVF10은 돌연변이 발생 (mutant frequency)이 모든 농도에서 유의한 증가가 없었지만, RW1은 돌연변이 발생이 16 주 동안 농도의 존적으로 유의하게 증가하였고 1 mg 투여군에서도 유의한 증가를 보였다. RW1, MMVF10 등의 시험물질을 투여한 후 4주간은 단회투여군과 연속투여군 등 모든 투여군에서 유의한 돌연변이 발생 증가는 보이지 않았다. 시험물질을 투여 후 16주에 RW1, MMVF10 등의 시험물질을 투여한 시험동물의 폐포 macrophage와 폐 상피세포를 comet assay로 측정된 결

과 DNA 가닥 절단 (DNA strand breaks)은 증가하였으며, 시험동물의 BAL (broncho-alveolar lavage)액 속의 호중구를 측정된 결과에 의하면 폐 염증은 MMVF10 보다 RW1에서 심하게 나타났다. 염증반응은 시험물질을 2 mg 투여한 군이나 8 mg을 투여한 군 간의 차이는 미미하였다. MMVF10은 시험동물의 폐에서 약한 염증 반응을 보였지만 돌연변이 반응은 보이지 않았다.

본 연구는 사람의 피부, 눈, 상부 호흡기 자극 물질로 알려져 있는 암면에 대한 물리 화학적인 특성을 분석한 후, 시험동물의 기도내로 주입하여 시험동물의 폐 조직을 관찰하여 암면이 시험동물의 호흡기에 미치는 영향을 평가하고, 전자현미경과 EDS를 이용하여 암면의 생체 내에서의 물리화학적 변화 분석을 통하여 암면의 생체내구성을 평가하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시험물질

시험물질은 국내에서 제조되어 유통되고 있는 암면 보온통 (k사, 보온단열용)을 사용하였으며, 양성대조물질로 사용한 백석면 표준품은 General Science Cooperation (Tokyo, Japan)에서 구입한 UICC (International Union against Cancer) 제품을 사용하였다.

1) 특성 분석을 위한 시료제작

시료는 Sakai 등(1991)의 시료제작 방법에 따라 시료를 막자사발로 잘게 부수어, 증류수 100 ml가 들어 있는 유리병에 1 mg 씩 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 vapor를 이용하여 12 시간 동안 용해, 건조시켰다.

2) 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 10,000 ~ 5,000 배율에서 길이와 직경의 비율이 3:1이 넘는 10 개 이상의 섬유를 임의로 선정하여 섬유

의 길이와 직경 등의 특성을 파악하고, EDS로 각 섬유유의 구성원소 성분비율 (atomic %)을 구하였다.

2. 시험동물 및 사육환경

시험동물은 특정병원체 부재동물 (Specific Pathogen Free, SPF)인 Sprague-Dawley (SD) Rats 수컷 7 주령을 구입하여 barrier system의 동물실에서 14 일간 순화시킨 후 건강하고 발육 양호한 동물을 시험동물로 사용하였다. 시험동물은 체중을 지표로 하여 대상군 별로 체중편차가 최소화 되도록 하여, 대조군 (6 마리 x 1 개군), 백색면 투여군 (6 마리 x 4 개군), 암면 투여군 (6 마리 x 4 개군) 등으로 군을 구성하였다.

동물사육실은 온도 22 ± 3 °C, 상대습도 50 ± 20 %, 환기회수 13~18 회/hr, 조명시간 12 시간 (오전 9 시 ~ 오후 9 시) 및 조도 150 ~ 300 Lux로 설정되었으며, 사료는 방사선 멸균된 실험동물용 고형사료 (Labdiet 5002PMI)를 구입하여 자유롭게 섭취시켰다. 물은 미세여과기 및 자외선을 이용하여 여과, 소독된 상수도수를 자유로이 섭취시켰다. 모든 동물은 전 시험기간 동안 개별 케이지에 한 마리씩 수용하였다. 시험기간 중 사육 상자에는 시험번호 및 동물번호를 기입한 개체식별 라벨을 붙였다.

3. 투여경로 및 투여방법

시험동물은 Ketamin (유한양행)으로 마취한 후, 시험물질은 잘게 갈아서 2기압, 121 °C로 15분간 고압 증기 멸균하여 시험동물 한 마리당 2 mg/0.3ml in saline 농도로 시험동물의 기도내로 주입 (intratracheal instillation) 하였다 (Bellmann & Muhle, 1997).

4. 체중측정 및 임상증상관찰

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

5. 병리검사

1) 임상관찰 및 육안 검사

모든 시험동물에 대하여 1 일 1 회 임상관찰을 실시하고, 부검 시 모든 시험동물에 대하여 ethyl ether를 사용하여 시험동물을 마취시켜 복대동맥에서 채혈한 후 전 장기에 대하여 육안 검사를 하였다.

2) 장기중량 측정 및 조직 검사

폐 장기중량 검사를 위하여 대조군 6 마리와 석면 투여 후 28 일차 시험군 6 마리, 암면 투여 후 28 일차 시험군 6 마리를 부검하여 모든 시험동물의 오른쪽 폐 중량을 측정하였다. 폐 조직검사를 위하여 시험물질을 투여한 후 3 일차, 7 일차, 14 일차, 28 일차 등 시간 경과별로 군구성한 시험동물의 오른쪽 폐를 절취하였으며, 절취한 폐 장기는 10 % 중성포르마린 용액에 고정하였다. 고정된 오른쪽 폐 장기조직은 탈수한 후 파라핀으로 포매하고 마이크로톰으로 박절한 후 헤마톡시린과 에오신으로 염색하여 폐 조직에 대한 염증 반응을 관찰하였으며, 또한 폐조직의 섬유화를 감별하기 위하여 Masson's trichrome 염색을 하여 광학현미경으로 관찰하였다.

6. 폐 fiber 분석

10 % 중성포르마린에 고정시킨 왼쪽 폐 조직은 공기 중에서 건조시킨 뒤 건조기에서 하룻밤 건조시킨 다음, 폐 무게를 측정한 후 저온회화로 (Low Temperature Plasma Asher, Yamato, Japan)에 산소를 공급하면서 하룻밤 회화시켰다. 회화된 폐 조직은 Fiber free 증류수에 녹여 nucleopore filter (Millipore GTTP 02500, nucleopore filter, 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 vapor를 이용하여 12 시간 동안 용해 및 건조시켜 고정된 후 폐내 fiber 측정을 위한 시료로 사용하였다. 시험동물에 시험물질을 주입하기 전의 시험물질 분석방법과 같은 조건으로 투과전자현미경과 EDS를 이용하여 시험물질을 투여한 후 3 일차, 7 일차, 14 일차, 28 일차 등 시간 경과별로 군구성한 시험동물의 왼쪽 폐 시료에서 각 군당 10 개 이상의 fiber를 선정하여 각 fiber의 크기와 성분을 분석하였다.

7. 통계처리

폐무게 변화는 t-test로 유의성을 검정하였으며, 체중 변화, 폐 내 fiber의 EDS 분석 결과는 일원배치분산분석 (one-way ANOVA)를 이용하여 통계학적 유의성을 검정하였고, Dunnett 방법이나 Dunn 방법으로 시험물질 투여군 간의 통계학적 유의성을 검증하였으며 유의수준 (α)은 $p < 0.05$ 와 $p < 0.01$ 에서 검정하였다. 모든 시험결과 분석 자료는 평균과 표준편차로 나타내었다.

III. 연구결과

1. 시험물질 특성분석

투과전자현미경과EDS를 이용하여 시험물질의 형태를 살펴보고 원소구성비를 측정하였다. 암면 (평균직경 2.6 μm)의 평균직경은 백석면 (평균직경 0.03 μm)에 비하여 약 100배 정도 굵은 모양을 보였으며, 암면 (평균길이 25.9 μm)의 평균길이는 백석면 (평균길이 5.5 μm)에 비하여 약 5배 정도 긴 형태를 보였다. 구성원소는 백석면은 Mg 성분 58.07 %, Si 성분 40.50 %, Fe 1.43 % 으로 나타났으나, 암면은 Mg 5.21 %, Al 16.26 %, Si 41.77 %, Ca 22.20 %, Fe 9.63 % 그리고 Na 3.00 %, K 1.71 %, Ti 0.79 % 등의 미량원소가 나타났다. 암면에서는 백석면에서는 측정되지 않는 Al, Ca과 Na, K, Ti 등의 미량원소가 나타났으며, 백석면에서는 Mg 성분이 가장 높았으나 암면에서는 Si 성분이 가장 높게 나타났다(table 1).

2. 체중 변화

대조군 6 마리와 석면 투여 시험군 6 마리, 암면 투여 시험군 6 마리에 대하여 시험물질 투여 후 1 주일 간격으로 체중 변화를 측정한 결과, 대조군, 암면 투여군, 백석면 투여군 등 모든 투여군에서 유의한 변화는 없었다 (figure 1).

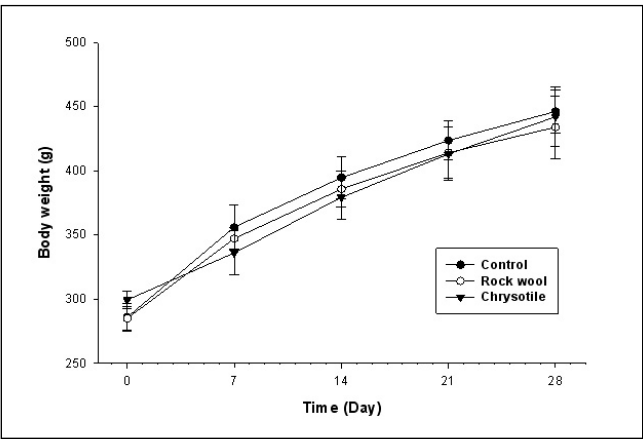

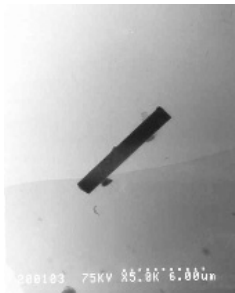


Figure 1. Body weight change of SD male rats after instillation.

Table 1. Characteristics of chrysotile and rock wool fibers.

Material(Magnification)	STEM image	Element Composition(Atomic %)
Chrysotile ($\times 10,000$)		Mg 58.07 ± 0.823 Si 40.50 ± 0.915 Fe 1.43 ± 0.126 D= $0.03 \pm 0.023 \mu\text{m}$ L= $5.5 \pm 5.26 \mu\text{m}$
Rock wool ($\times 5,000$)		Mg 5.21 ± 1.108 Al 16.26 ± 1.452 Si 41.77 ± 2.959 Ca 22.20 ± 3.826 Fe 9.63 ± 1.973 Na 3.00 ± 1.105 K 1.71 ± 0.451 Ti 0.79 ± 0.158 D= $2.60 \pm 2.191 \mu\text{m}$ L= $25.93 \pm 15.295 \mu\text{m}$

3. 병리검사

1) 폐 무게 변화

대조군 6 마리와 석면 투여 후 28 일차 시험군 6 마리, 암면 투여 후 28 일차 시험군 6 마리에 대하여 폐 무게를 측정 한 결과, 대조군에 비하여 백석면 투여군, 암면 투여군 등 모든 시험물질 투여군에서 절대 폐 무게의 유의한 증가 ($p < 0.01$)를 보였으며, 체중에 대한 장기무게의 비율로 계산한 상대 폐 무게에서는 백석면 투여군은 대조군에 비하여 유의한 증가 ($p < 0.01$)를 보였으나 암면 투여군에서는 유의한 변화가 없었다 (table 2).

2) 육안검사

시험물질 투여 후 28 일 동안 모든 시험동물에 대한 임상 관찰 결과, 시험물질에 의한 특별한 임상증상은 관찰되지 않았으며, 시험물질 투여 후 28일차에 시험동물을 희생하여 모든 장기에 대한 육안 검사 결과에서 시험물질에 의한 특별한 증상은 관찰되지 않았다.

3) 조직 병리검사

대조군 6 마리와 석면 투여 후 3 일차, 7 일차, 14 일차, 28 일

차에 각 시험군 별로 6 마리 시험동물을 희생하여 오른쪽 폐 조직을 절취하여 광학현미경으로 폐 조직을 관찰한 결과 (figure 3, 4), 백석면 투여군은 투여 3일차에 시험동물 6 마리 중 4 마리에서 염증반응 (granuloma)을 보이기 시작하여 투여 7 일차 이후 모든 백석면 투여군에서 염증반응이 나타났으며 투여 후 28 일차까지 시간이 경과하여도 염증 반응은 줄어들지 않았으나, 암면 투여군에서는 투여 3 일차에서 시험동물 6 마리 중 3 마리, 투여 7 일차에서 시험동물 6 마리 중 2 마리에서 나타났으나 시간이 경과할수록 염증반응은 줄어들어 14 일차에서는 6 마리 중 1 마리에서만 염증반응을 보였으며 투여 28 일차에서는 시험동물 6 마리 모두 염증반응이 나타나지 않았다 (table 3). 폐조직의 섬유화를 감별하기 위하여 Masson's trichrome 염색을 하여 광학현미경으로 관찰한 결과에서는 백석면 투여 후 28 일차의 시험동물 6 마리 중 6 마리에서 가벼운 섬유증 (slight fibrosis)를 관찰할 수 있었으나, 암면 투여군에서는 섬유증을 관찰 할 수 없었다 (figure 2).

4. 폐 조직 섬유상 검사

1) Fiber 농도 및 형태 분석

백석면 (평균 직경 $0.03 \mu\text{m}$, 평균 길이 $5.5 \mu\text{m}$)과 암면 (평균 직경 $2.6 \mu\text{m}$, 평균 길이 $25.93 \mu\text{m}$)을 한 마리당 2 mg/0.3ml in

Table 2. Lung weight of SD male rats of 28days after instillation.

		Absolute lung weight (unit : mg)	Relative lung weight (unit : %)
Control	Left	543.3 ± 39.35	0.122 ± 0.007
	Right	1011.8 ± 51.21	0.243 ± 0.012
Chrysotile	Left	$617.7 \pm 32.73^{**}$	$0.140 \pm 0.008^{**}$
	Right	$1230.7 \pm 120.53^{**}$	$0.279 \pm 0.027^{**}$
Rock wool	Left	$549.5 \pm 37.95^{**}$	$1035.2 \pm 78.71^{**}$
	Right	0.127 ± 0.007	0.238 ± 0.011

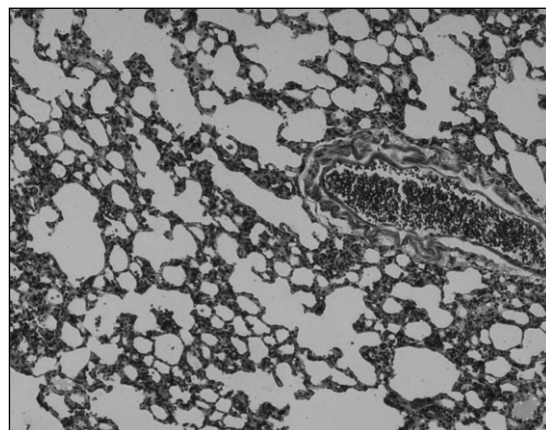
All values are expressed as mean \pm SD

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

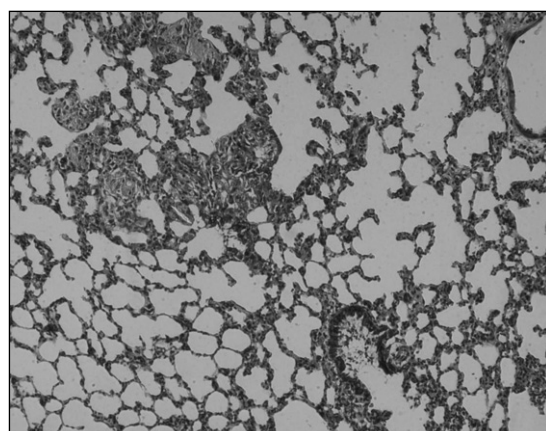
Table 3. Histopathological finding of lungs of SD male rats of 28 days after instillation

	Control		Chrysotile		Rock wool	
	granuloma	fibrosis	granuloma	fibrosis	granuloma	fibrosis
3 day	-		4/6***		3/6*	
7 day	-		6/6***		2/6**	
14 day	-		6/6***		1/6*	
28 day	-		6/6***	6/6#	0/6*	

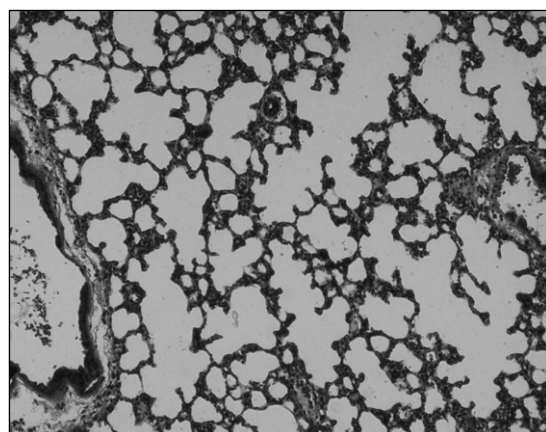
*** : granuloma +++, ** : granuloma ++, * : granuloma +, # : slight fibrosis



control (28 days)



chrysotile (28 days)



Rock wool (28 days)

Figure 2. Histopathology of the lung of SD male rats instilled chrysotile and rock wool. chrysotile ; (*) granuloma and slight fibrosis (Masson' trichrome, x 100, SD rat).

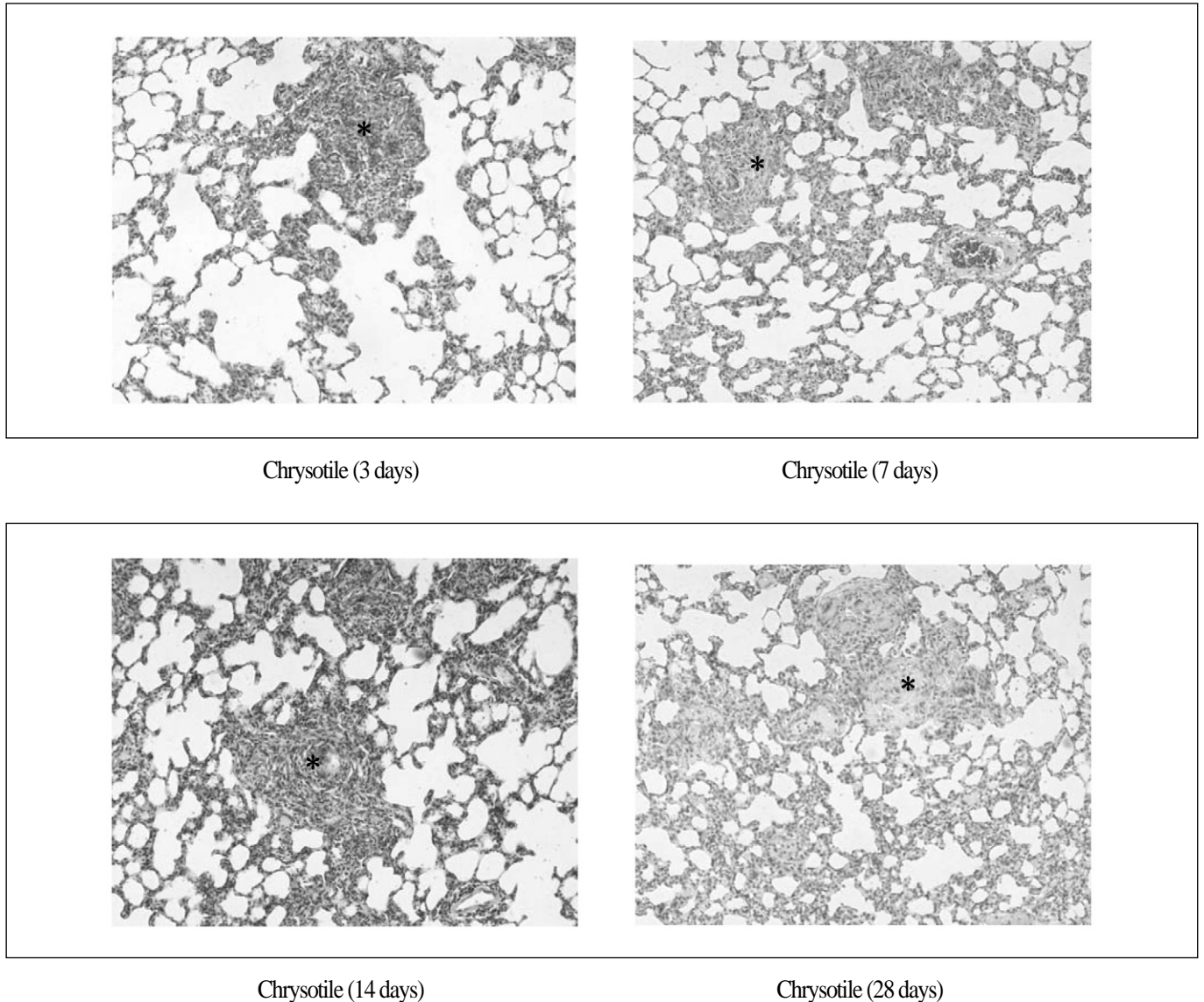


Figure 3. Granuloma and slight fibrosis (*) of the lung of SD male rats after chrysotile instillation. H&E staining (X 100)

saline 농도로 시험동물의 기도 내로 주입하고 3 일, 7 일, 14 일, 28 일 후에 부검하여 각 동물의 폐 내의 섬유를 투과전자 현미경으로 관찰한 결과 (figure 5), 시험동물 폐 1 그램 당 시험물질 농도는 암면 투여 후 3 일차에 0.059272×10^6 fibers, 7 일차에 0.056558×10^6 fibers, 14 일차에 0.046249×10^6 fibers로 감소하는 경향을 보였으며, 28 일차에는 0.020444×10^6 fibers로 50 % 이상의 감소를 보였다 (table 4). 폐 조직 내의 암면의 직경은 $1 \mu\text{m}$ 이하에서부터 $5 \mu\text{m}$ 이상 다양하게 분포하고 있었으며 암면을 시험동물의 폐 내로 투여한 후 7 일차 이후 직경 $5 \mu\text{m}$ 이상의 분포는 줄어드는 경향을 보였으며 28 일차에는 직경 $5 \mu\text{m}$ 이상의 분포가 10 %를 보였다. 폐 조직 내의 암면의 길이도 $10 \mu\text{m}$ 이하에서부터 $50 \mu\text{m}$ 이상 다양하게 분포하고 있

었으며 시험동물의 폐 내로 투여한 후 7 일차 이후 $50 \mu\text{m}$ 이상의 분포는 줄어드는 경향을 보였으며 28 일차에는 길이 $50 \mu\text{m}$ 이상의 분포가 30 %를 보였다 (table 4). 시험동물에 투여된 백석면은 농도분석을 할 수 없을 정도로 폐 내에 숫자가 많았으며, 시험동물 폐 내의 백석면의 직경과 길이는 백석면을 시험동물의 폐 내로 투여 한 후 시간이 경과하여도 뚜렷한 차이를 보이지는 않았다 (table 5).

2) 폐 fiber 원소 분석

시험물질의 시간 경과별 생체내구성을 비교하기 위하여 시험물질을 시험동물의 기관내로 1회 투여하고 투여 후 3 일차, 7 일차, 14 일차, 28 일차에 시험동물을 해부하여 시험물

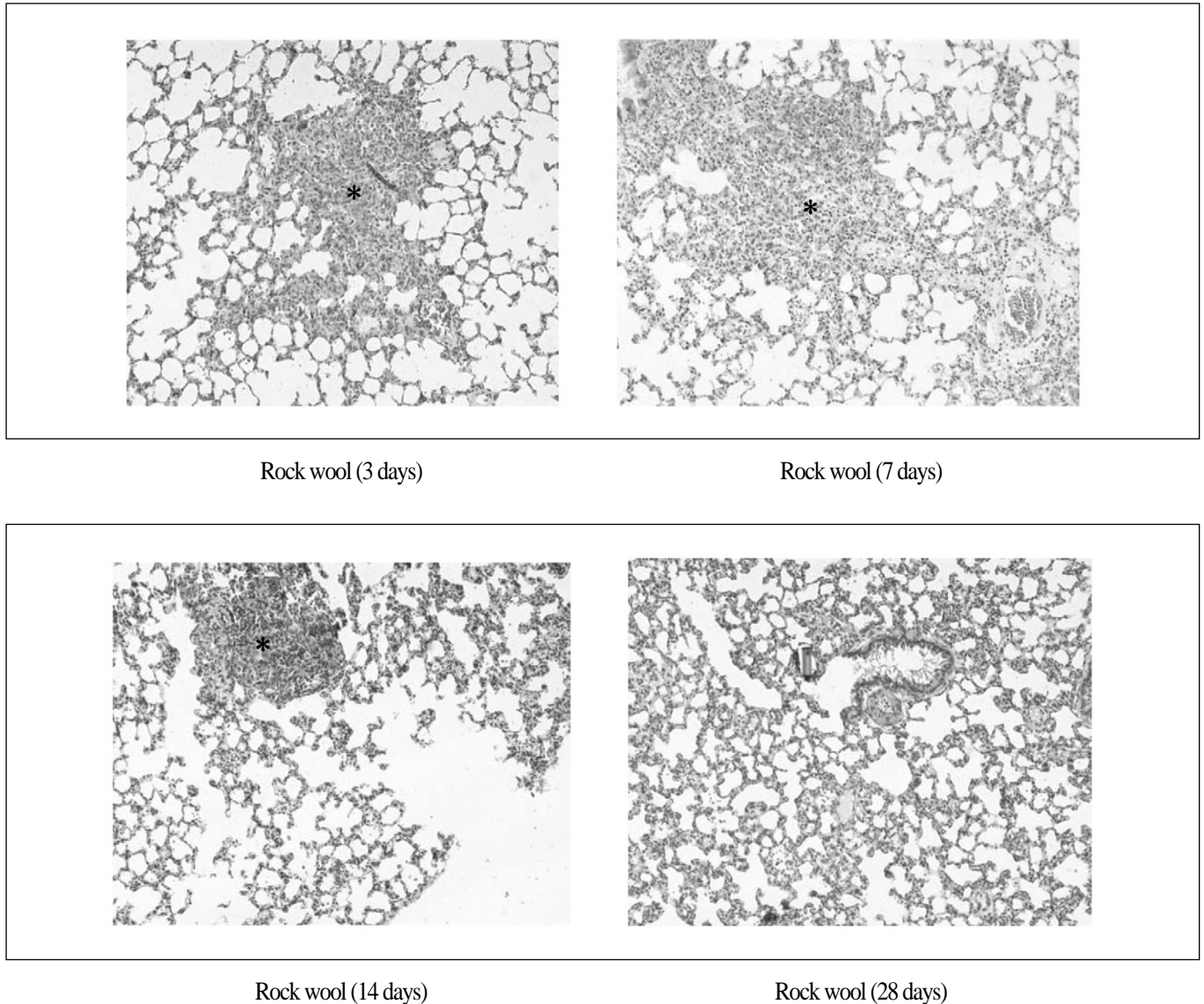


Figure 4. Granuloma (*) of the lung of SD male rats after rock wool instillation. H&E staining (X 100)

질별로 폐 내에서의 섬유상물질의 변화를 전자현미경과 EDS를 이용하여 분석한 결과, 시험동물의 기도내로 백석면을 투여하기 전의 백석면의 구성성분은 Mg 성분 58.07 %, Si 성분 40.50 %, Fe 1.43 % 으로 나타났으나, Si 성분을 기준으로 시험동물의 폐 내에서의 백석면의 구성원소 변화는 백석면 투여 후 7 일차 (Si 49.21 %)부터 14 일차 (Si 46.32 %), 28 일차 (Si 47.82 %) 등 시간 경과에 따라 백석면 투여 전에 비하여 유의한 변화를 보였으며 (table 10, $p<0.05$), 시험동물 기도 내로 암면을 투여하기 전의 암면 구성성분은 Mg 5.21 %, Al 16.26 %, Si 41.77 %, Ca 22.20 %, Fe 9.63 % 그리고 Na 3.00 %, K 1.71 %, Ti 0.79 % 등의 미량원소가 나타났으나, Si 성분을 기준으로 시험동물의 폐 내에서의 암면의 구성원소 변화는 암면 투여 후 3 일차 (70.59 %)부터 7 일차 (Si 62.34 %), 14 일차 (Si

65.17 %), 28 일차 (Si 78.96 %) 등 시간 경과에 따라 암면 투여 전에 비하여 유의한 변화 (table 10, $p<0.05$)를 보여 암면의 생체 내 구성원소 변화는 백석면보다 시간적으로 빠른 변화를 보였다 ($p<0.05$)

IV. 결론 및 고찰

흡입된 섬유유의 유해성은 흡입량과 섬유의 크기, 화학적 조성, 생체내구성, 표면특징 등에 달려 있고, 시험물질을 시험동물에 투여할 때는 최대내성량 (maximum tolerated dose, MTD) 초과 유무에 따라 제거율이 다르기 때문에 최대 내성량을 초과하지 않도록 주의하여야 한다 (Tanaka 등, 2001). 본

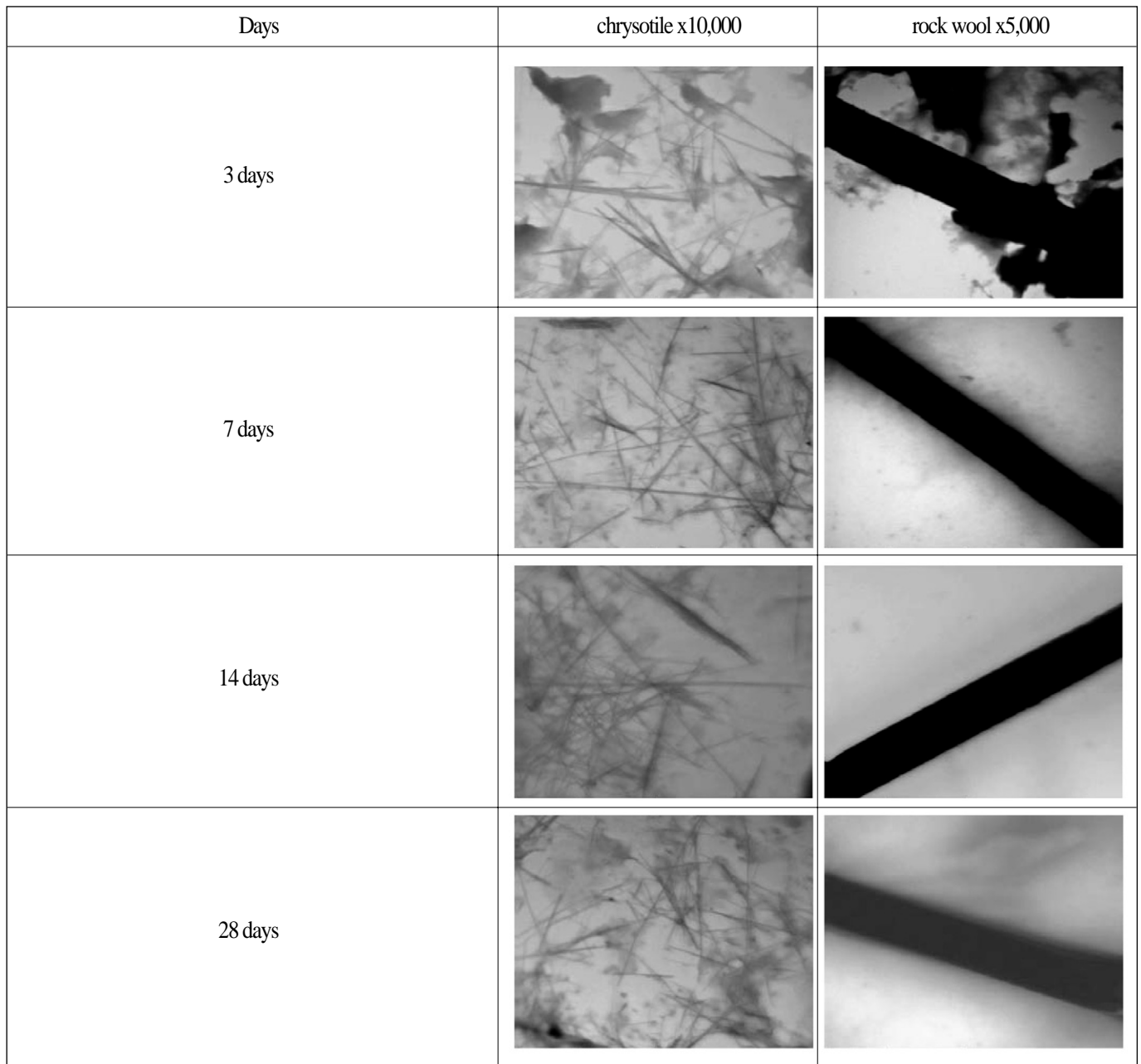


Figure 5. STEM image of fibers in the lung of SD male rats after instillation.

Table 4. Fibers concentration and distribution from lung of SD male rats instilled rock wool.

Concentration ($\times 10^6$ fibers /g of dry lung)Sample no.		diameter (μm)			length (μm)		
		<1.0	1.0-5.0	≥ 5.0	<10	10-50	≥ 50
3 days	0.059272	3%	64%	33%	3%	61%	36%
7 days	0.056558		28%	72%		44%	56%
14 days	0.046249	9%	50%	41%	5%	64%	31%
28 days	0.020444	10%	80%	10%		70%	30%

Table 5. Fibers distribution from lung of SD male rats instilled chrysotile.

	diameter (μm)	length (μm)
3 days	0.0257 ± 0.0120	2.1733 ± 1.9004
7 days	0.0276 ± 0.0141	1.9867 ± 1.6228
14 days	0.0249 ± 0.0125	2.4469 ± 2.0309
28 days	0.0265 ± 0.0135	2.6587 ± 2.5611

Table 6. Change of Si atomic % from lung of SD rats instilled fibers.

	diameter (μm)	length (μm)
Before	40.50 ± 0.915	41.77 ± 2.959
3 days	42.47 ± 2.207	$70.59 \pm 19.561^*$
7 days	$49.21 \pm 3.710^*$	$62.34 \pm 21.517^*$
14 days	$46.32 \pm 2.776^*$	$65.17 \pm 21.307^*$
28 days	$47.82 \pm 3.150^*$	$78.96 \pm 22.596^*$

All values are expressed as mean \pm SD

Significant differences as compared with control : *p < 0.05

연구에서는 Bellmann과 Muhle (1997)의 시험방법에 따라 시험동물당 시험물질량 2 mg를 0.3 ml saline에 희석하여 기도내로 주입하였다. IARC (2002)에 의하면, 호흡기 내 섬유유체의 생체내구성은 섬유유의 이동과 제거 등 물리적인 제거과정과 화학적 용해, 여과, 쪼개짐 등 물리화학적 과정에 의하여 결정되고, 섬유유의 길이에 따라 제거되는 양태는 다르며, 짧은 섬유유체는 macrophage에 의하여 활발히 탐식되고 산성 환경 속에서 화학적 용해와 여과에 의하여 제거되지만 긴 섬유유의 경우에는 macrophage에 의하여 완전히 탐식되지 않으며 pH에 따라 화학적 용해와 여과가 지배를 받게 된다. 폐에 축적된 인조유리섬유는 섬유유의 길이에 따라 macrophage에 의하여 완전히 탐식되거나 부분적으로 탐식되게 되는데, 불완전한 탐식의 경우에는 강력한 염증 자극물이 되어 유전독성과 폐 세포의 증식을 초래하게 되며, 동물 모델에서 지속적인 염증과 섬유화는 종양 발전과 관련성을 가지게 되며, 인조유리섬유에 폭로되어 나타나는 가장 중요한 증상은 폐와 중피의 지속적인 만성염증, 섬유화, 세포증식이며, 랫드를 이용한 동물 시험에서 폐 내의 섬유(길이 20 μm 이상)의 생체내구성은 폐 섬유화와 흉막 종양 등의 병원성 (pathogenicity)과 상관관계가 있다 (IARC, 2002). 폐에 축적된 섬유상물질은 폐포 macrophage의 활성을 유발하며, 폐포 macrophage와 실질세포는 TNF (tumor necrosis factor), IL-1 (interleukin-1) 등과 같은 사이토카인 (cytokine)을 분비하고, 이러한 사이토카인은 단백질을 가수분해하는 프로테아제 (proteinase) 효소를 방출하여 폐 병변을 일으키게 된다 (Morimoto와 Tanaka, 2001).

IARC (2002)에 의하면 암면을 장기간 흡입으로 폭로한 시

험과 암면을 기도내로 주입한 시험에서는 폐종양이나 중피종을 발견할 수 없었으나, 암면을 복막내로 고농도 (약 109 fibers)로 주입한 시험에서는 유의한 중피종이 발견된 바 있으며, Hesterberg 등 (1995)이 흡입시험 (nose-only)한 결과에 의하면 랫드에 폭로된 내화세라믹섬유 (refractory ceramic fibres, RCF)는 폐 섬유화, 폐종양, 중피종 등이 나타났으나, 암면 (slag wool, MMVF22)에 폭로된 랫드에서는 염증반응은 나타났으나 폐종양, 중피종 등은 나타나지 않았으며, 암면 (stone wool, MMVF21)에 폭로된 랫드에서도 미세한 폐섬유화는 나타났으나 폐종양, 중피종 등은 나타나지 않았다. 이러한 결과로 섬유유의 양이나 크기 그리고 내구성만이 섬유유의 독성을 결정하는 요소가 아니라 섬유유의 표면 물리화학적 특성도 중요한 요소임을 제시한 바 있다.

Kamstrup 등 (2004)이 암면 (high-aluminium low-silica HT type stone wool)을 랫드 (Male Wistar rats)에 150 long fibres/ml (length>20 μm)를 하루에 6 시간, 주 5 일, 3 개월 동안 흡입 (nose-only inhalation) 폭로시키고 1 주 후, 1.5 개월 후, 3 개월 후 폐의 변화와 폐 속의 섬유수를 평가한 결과에 의하면, 폭로 1.5 개월 후 시험군의 폐 무게는 유의한 증가를 보였으나 폭로 3 개월 후 시험군의 폐 무게에서는 유의한 증가가 없었고, 폭로 3 개월 후 시험군의 폐 내의 긴 섬유 농도 (length>20 μm)는 1~7 % 감소하였다. 3 개월 폭로 종료 직후, 폭로 중지 1.5 개월 후, 폭로 중지 3 개월 후에 시험동물의 폐 조직에 대한 형태학적인 관찰에서는 일부 시험동물에서 폐포 macrophage 집적이나 미세한 육아종이 세기관지 폐포 접합부에 나타났으나 섬유조직은 나타나지 않았다. 양성 대조군

으로 사용한 MMVF21 시험군에서는 폭로 종료 후에 나타났던 미세한 섬유증 (minimal interstitial fibrosis)이 폭로 종료 후 1.5 개월, 폭로 종료 후 3 개월에서는 서서히 줄어들었다. Porter 등 (2004)에 의하면 이물질이 폐 조직에 유입되면 폐 조직 내에 염증세포의 유입과 부종, collagen 축적 등으로 폐 무게가 증가된다고 하였다. 본 연구에서는 시험물질 투여 후 28 일차에 백석면 투여군의 상대 폐 무게에서는 대조군에 비하여 유의한 증가를 보였으나 암면 투여군에서는 상대 폐 무게의 유의한 변화가 없었다. 이러한 폐 무게의 변화는 백석면 투여군에서는 백석면 투여 후 3 일차에 광학현미경으로 폐조직을 관찰한 결과, 섬유모세포, 호중구, 임파구, 형질세포 등이 나타나는 염증반응 (granuloma)을 보이기 시작하여 투여 후 28 일차까지 시간이 경과하여도 염증 반응은 줄어들지 않았으나, 암면 투여군에서는 투여 3 일차에서는 시험동물 6 마리 중 3 마리에서 염증반응이 나타났으나 시간이 경과할수록 염증반응을 보이는 병변의 크기와 빈도수는 줄어들어 암면 투여 28 일차에서는 시험동물 6 마리 모두 염증반응이 나타나지 않은 결과와 일치하였다. Castranova 등 (2002)에 의하면, 랫드에 실리카 (silica)를 41 일간 폭로한 결과, 폐 염증과 폐 손상은 있었으나 섬유증은 없었으며, 41~116 일간 폭로한 군에서는 폐 섬유증을 동반한 폐 염증과 폐 손상이 관찰되었다. 이러한 실험결과는 폐에 유해물질이 침투되면 폐 방어기전 (Pulmonary defense mechanism)은 처음에는 방어가 가능하지만 일정한 폐의 한계치 (threshold lung burden)를 넘어서면 폐질환이 전개되는 것을 막을 수는 없다는 것을 보여준 바 있으나, 본 연구 조건에서는 암면 투여 후 28 일 이후에는 시험동물의 폐 조직에서 염증반응은 소실되는 것으로 보아 암면이 시험동물의 폐 조직에서 유발한 병변은 투여를 중지하고 일정 시간이 경과하면 정상적으로 회복될 수 있는 가역적 병변으로 판단되었다.

인조유리섬유의 반감기는 설치류에서는 약 70 일 정도로 알려져 있으나 (IARC, 2002), 본 연구에서 암면의 생체내구성을 평가하기 위하여 암면을 투여한 시험동물의 폐 내의 암면의 농도변화를 측정된 결과 시험동물 폐 1 그람 당 시험물질 농도는 암면 투여 후 3 일차에는 0.059272×10^6 fibers를 보였으나 28 일차에는 0.020444×10^6 fibers로 50 % 이상의 감소를 하여 암면의 생체 내 반감기는 28 일로 판단되었다. 유리섬유를 1 개월간 랫드에 폭로시킨 후 3 개월간 랫드의 폐 내에서의 생물학적 반감기를 조사한 결과에서는 20 μ m 이상의 유리섬유는 1.4 개월이었으나, 크기분포 (size distribution)는 변화가 없었다 (Ishimatsu 등, 1998). Kamstrup 등 (1998)이 랫드에 MMVF34와 MMVF21 등 두 종류의 암면 (stone wool)을 각각 3 개월과 12 개월을 흡입 (nose-only inhalation)시키고 폭로를 중지하고 6 개월 후에 생체내구성을 평가한 결과에서는

MMVF34는 폭로기간에 관계없이 유사한 생체내구성을 보였으며, 제거 반감기 (elimination half-times)를 비교한 결과 MMVF34는 MMVF21보다 생체내구성이 약하고 조직병리학적 변화도 적은 것으로 나타났지만, 상대적으로 긴 섬유를 기관내로 투여한 시험에서는 흡입으로 폭로시킨 것보다 제거 반감기가 길었다. 본 연구에서 시험물질을 시험동물의 기도 내로 투여한 후 시간 경과별로 시험물질의 폐 조직 내에서의 형태 분포를 분석한 결과, 암면을 시험동물의 폐 내로 투여한 후 7 일차 이후 직경이 5 μ m 이상이고 길이가 50 μ m 이상의 분포는 줄어드는 경향을 보였다. 시험물질을 시험동물의 기도 내로 투여한 후 시간 경과별로 시험물질의 폐 조직 내에서의 구성원소 변화율을 비교하기 위하여 시험동물의 폐 내의 시험물질의 Si 원소변화를 분석한 결과에서는 백석면은 투여 후 7 일차부터 투여 전에 비하여 Si 원소 구성비가 유의한 증가를 보였으나, 암면은 투여 후 3 일차부터 투여 전에 비하여 Si 원소 구성비가 유의한 증가를 보여, 암면의 생체 내 구성원소 변화는 백석면보다 시간적으로 빠른 변화를 보여 암면은 백석면에 비하여 생체내구성이 약한 것으로 판단되었다.

이상의 시험결과로 암면은 폐 조직에 granuloma 형성 등 호흡기에 영향을 미치는 물질로 판단되었으며, 시험동물의 생체 내에서 반감기는 28 일 정도로 나타났다. 시험동물의 폐 내에서의 구성원소 변화도 백석면에 비하여 빠른 것으로 판단되었지만, 암면 투여 후 28 일 이후에는 시험동물의 폐 조직에서 염증반응이 소실되는 것으로 판단되었다.

REFERENCES

- 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
- Boillat MA. Synthetic mineral fibers. Schweiz Med Wochenschr 1999 Mar; 129(12):468-74
- Castranova V, Porter D, Millecchia L, Ma JY, Hubbs A and Teass A. Effect of inhaled crystalline silica in a rat model: Time course of pulmonary reactions. Mol Cell Biochem 2002;234-235
- De Vuyst P, Dumortier P, Swaen GM, Pairon JC, Brochard P. Respiratory health effects of man-made vitreous (mineral) fibres. Eur Respir J 1995 Dec;8(12):2149-73
- Foa V, Basilico S. Chemical and physical characteristics and toxicology of man-made mineral fibers. Med Lav 1999 Jan-Feb;90(1):10-52
- Hesterberg TW, Miiller WC, Thevenaz P, Anderson R. Chronic

- inhalation studies of man-made vitreous fibres: characterization of fibres in the exposure aerosol and lungs. *Ann Occup Hyg* 1995 Oct;39(5):637-53.
- IARC (international agency for research on cancer). Volume 81, man-made vitreous fibers. 2002.
- Ishimatsu S, Oyabu T, Hori H, Yamato H, Morimoto Y, Tsuda T, Higashi T, Tanaka I. Biopersistence of inhaled glass fibers in rat lungs, In: *Advances in the prevention of occupational respiratory diseases*. eds, by Chiyotani K, Hosoda Y, Aizawa Y. Amsterdam: Elsevier science; 1998. p.69-6.
- Kamstrup O, Davis JM, Ellehauge A, Guldborg M. The biopersistence and pathogenicity of man-made vitreous fibres after short- and long-term inhalation. *Ann Occup Hyg* 1998 Apr;42(3):191-9
- Kamstrup O, Ellehauge A, Bellmann B, Chevalier J, Davis JM. Subchronic inhalation study of stone wool fibres in rats. *Ann Occup Hyg* 2004 Mar;48(2):91-104
- Lee KP, Barras CE, Griffith FD, Waritz RS. Pulmonary response to glass fiber by inhalation exposure. *Lab Invest* 1979;40:123-133
- Morimoto Y and Tanaka I. In vivo studies of man made mineral fibers - fibrosis related factors - *Industrial Health* 2001;39:106-113
- Plato N, Westerholm P, Gustavsson P, Hemmingsson T, Hogstedt C, Krantz S. Cancer incidence, mortality and exposure-response among Swedish man-made vitreous fiber production workers, *Scand J Work Environ Health* 1995 Oct; 21(5):353-61
- 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
- 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
- Shibata K, Kudo Y, Tsunoda M, Hosokawa M, Sakai Y, kotani M, Aizawa Y. Magnetometric evaluation of the effects of man-made mineral fibers on the function of macrophages using the macrophage cell line RAW 264.7. *Industrial Health* 2007; 45:426-436
- Tanaka I, Yamamoto H, Oyabu T, Ogami A, Biopersistence of man-made fibers by animal inhalation experiments in recent reports. *Industrial Health* 2001;39:114-118
- Tikes F, Beck EG. Macrophage functions after exposure to mineral fibers, *Environ Health Perspect* 1983;51:67-72
- Topinka J, Loli P, Dusinska M, Hurbankova M, Kovacikova Z, et al. Mutagenesis by man-made mineral fibres in the lung of rats, *Mutat Res* 2006 Mar;595 (1-2):174-83
- Warheit DB, Hart GA, Hesterberg TW, Collins JJ, Dyer WM et al. Potential pulmonary effects of man-made organic fiber (MMOF) dusts. *Crit Rev Toxicol* 2001 Nov;31(6):697-736