

돈사 분진 함유 내독소 수준과 축사 작업자들의 세포면역력간 상관성 분석

김형아¹ · 김지연 · 신경민 · 조지훈 · Katharine Roque · 조광호² · 허 용*

¹가톨릭대학교 의과대학 예방의학교실, 대구가톨릭대학교 의료생명산업대학 산업보건학과, ²대구파티마병원

Relationship between Endotoxin Level of in Swine Farm Dust and Cellular Immunity of Husbandry Workers

Hyoung Ah Kim¹ · Ji Youn Kim · Kyeong Min Shin · Ji Hoon Jo ·
Katharine Roque · Gwang Ho Jo² · Yong Heo*

¹Catholic University of Korea, College of Medicine Dept. Preventive Medicine · Catholic University of Daegu,
College of Bio-Medical Sciences Dept. Occupational Health · ²Daegu Fatima Hospital

ABSTRACT

Objectives: Endotoxins in dust generated in occupational settings is known to contribute to the occurrence of respiratory illness among workers. The relationship between the level of endotoxins in total dust or respirable particulates collected from swine farms and immunological markers related with respiratory allergy was evaluated among swine husbandry workers.

Materials and Methods: Peripheral blood samples were collected from ten workers at ten swine farms at Gyeonggi province, Korea. Peripheral mononuclear cells were stimulated with phorbol 12-myristate 13-acetate and ionomycin for 48 hours. The levels of various cytokines produced at culture supernatants were determined using a commercially available ELISA kit. The concentration of particulate matter(PM₁₀) in the indoor air of the swine farms was evaluated using a PVC membrane filter and mini volume air sampler, and endotoxin levels in the dust were measured by Limulus Amebocyte Lysate Kinetic QCL method.

Results: Levels of endotoxins in the total dust were categorized into high(geometric mean: 109.35 EU/m³) and low concentrations(geometric mean: 0.95 EU/m³) for five swine farms. Interleukin-4 levels were higher in the high endotoxin group than in the low endotoxin group, while interferon- γ levels were lower in the high endotoxin group than in the low endotoxin group. The ratio(interferon- γ to interleukin-4), indicating immunologic skewedness against allergic reactivities, was lower in the high endotoxin group(1.15 \pm 0.60) than the low endotoxin group(3.09 \pm 2.38). In addition, the level of interleukin-13, another cytokine contributing to the occurrence of allergic responses, was significantly higher in the at the high endotoxin group(1.12 \pm 0.37 ng/ml) than in the low endotoxin group(0.37 \pm 0.04 ng/ml). Hematologic assessment showed significantly lower cellularity in the number of total leukocytes, neutrophils, and eosinophils in the high endotoxin group than in the low endotoxin group.

Conclusions: Even though a sufficient number of swine workers and farms were not investigated, this study generally suggests that the immunological function of swine farm workers exposed to high levels of endotoxin could be modulated toward allergic reactivities.

Key words : endotoxin, respiratory hypersensitivity, swine husbandry, total dust

I. 서 론

돈사, 계사, 우사를 포함한 축사에서 발생하는 분진, 내독소(Endotoxin), 미생물, 암모니아, 황화수소와 같

은 생물학적, 화학적 유해인자가 축산업에 종사하는 농업인들에게 주요한 직업성 질환 유발인자로 알려져 있다(Heo & Kim, 2003; Yoo et al., 2003; Cambra-López et al., 2010; Kim et al., 2012; Kimman et al., 2013).

*Corresponding author: Yong Heo, Tel: 053-850-3737, E-mail: yheo@cu.ac.kr.

Department of Occupational Health, College of Bio-Medical Sciences, Catholic University of Daegu, 13-13 Hayang-ro, Gyeongsan-si 712-702

Received: November 1, 2013, Revised: November 11, 2013, Accepted: December 12, 2013

축사에서 발생하는 유기분진은 주로 가축의 분변, 사료, 체모 등으로부터 발생되고 있는데, 유기분진 노출과 축산 농업인들의 호흡기계 질환 발생의 상관성에 대한 연구가 축산업이 국가 기간산업으로 발달하고 있는 유럽 국가들에서 활발히 진행되고 있다(Omland, 2002; Heutelbeck et al., 2009; Basinas et al., 2012).

본 연구진은 양돈업과 양계업에 종사하는 축산 농업인들을 대상으로 한 연구에서 동일 지역에 거주하면서 축산업에 종사하지 않는 일반 대조군에 비해 축산 농업인들에게서 항진된 혈장 IgE 및 히스타민 수준, interleukin-4(IL-4) 또는 interleukin-10 생성 수준 증가 등 호흡기 알레르기를 포함한 아토피 성향을 발현케하는 2형 보조 T 림프구(type-2 helper T lymphocyte) 기능이 상대적으로 우세함을 보고한 바 있다(Kim et al., 2005). 또한 양돈업 종사 축산농업인들을 대상으로 한 최근 연구에서 미국집먼지진드기, 유럽집먼지진드기, 바퀴벌레 등 주로 실내환경 알레르기 항원에 30%이상의 양성 반응을 보이고 있음을 보고하였다(Kim et al., 2012). 이러한 결과들은 우리나라 축산 농업인들에게서도 폐 기능 악화를 초래하는 농부폐증(Farmer's lung)이 직업성 질환으로 중요한 건강 위험 요인으로 작용할 수 있음을 의미한다고 판단된다.

축산 농업인들이 유기분진에 노출되어 호흡기 알레르기 과민반응인 천식, 알레르기성 비염 혹은 기관지염이 발생하는 배경 기전으로 분진내 함유된 내독소의 알레르기 반응 유도 촉매 역할에 관심이 모아지고 있다(Liu, 2002; Portengen et al., 2005; Cambra-López et al., 2010; Basinas et al., 2012). 내독소는 *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Psuedomonas* 등과 같은 그람 음성 세균의 세포벽 성분을 총칭하는 것으로 분진에 함유되어 노출될 때 100 EU/m³ 이상에서 호흡기계 염증이 유발되기 시작하여 2000 EU/m³ 이상에서는 심각한 폐렴 증상을 초래하는 것으로 알려져 있다(Sykes et al., 2011). 호흡기로 내독소가 들어오면 수지상세포(Dendritic cell), 탐식세포, 단핵구(Monocyte) 등 외부 물질에 일차적 방어 기능을 수행하는 자연면역체계의 세포들 표면에 발현되어 있는 CD14 수용체에 결합한다. 이후 CD14 발현 세포들을 포함한 여러 면역 세포들로부터 interleukin-6, tumor necrosis factor(TNF)-α와 같은 친염증성 사이토카인이 생성되고 이들 사이토카인의 순차적인 반

응 결과 기관지 수축, 폐에 호산구 축적 등과 같은 호흡기계 이상이 나타나게 된다(Liu, 2002; Tuchscherer et al., 2004; Tweedell et al., 2011).

본 연구는 돈사의 사육환경이 양돈 축산업에 종사하는 농업인들에게 미치는 건강영향 특히 면역기능의 변화를 평가하기 위한 연구의 일부로서, 내독소가 함유된 유기분진에 노출되었을 때 천식과 같은 호흡기 알레르기 질환 발현의 면역학적 배경기전이 되는 보조 T 림프구의 싸이토카인 생성 수준에 어떠한 변화가 나타나는지를 평가하기 위하여 진행되었다. 또한 내독소 수준에 따른 말초혈액 면역세포들의 양적인 변화 양상을 분석하였다. 이를 위하여 돈사내의 총분진, 호흡성분진 및 분진 내 내독소 수준을 평가하고 해당 돈사에서 작업하는 축산농업인들에서 얻어진 말초혈액내 T 림프구의 각종 싸이토카인 생성 수준을 분석하여 내독소 수준과 싸이토카인 생성 수준 간 상관성을 분석하였다.

II. 연구대상 및 방법

1. 연구대상

2012년 7월에서 8월에 걸쳐 경기도 A시, G시 및 I시에 소재하는 10개의 양돈 농장에서 양돈업을 전업으로 하고 있는 축산 농업인 각 1명씩 총 10명에 대하여 채혈을 실시하였다. 해당 축산 농업인들에게 연구목적을 설명하고 채혈동의(Informed consent)를 받은 뒤 10 ml 정맥혈을 채취하였다(대구가톨릭대학교병원 생명의학 연구윤리 심의위원회 승인번호 : CR-12-095-RES-001-R).

본 연구 대상이 된 10개 농장의 총분진내 내독소 수준을 분석한 결과 5개 농장은 0~6.8 EU/m³ 분포를 보여 상대적으로 낮은 농도였고 다른 5개 농장은 20.4 ~ 1198.8 EU/m³ 수준으로 상대적으로 높은 농도를 나타내는 Bimodal distribution 양상을 보여 내독소 수준이 20 EU/m³ 이상인 경우를 고농도 내독소 노출군으로, 10 EU/m³ 미만인 경우를 저농도 내독소 노출군으로 임의 설정하여 분석을 수행하였다. Table 1은 본 연구의 대상이 된 양돈 농업인들의 연령 및 양돈업 종사 기간을 비교한 것이다. 연구 대상자들은 모두 남성이었고 내독소 고농도 노출군 5명과 저농도 노출군 5명간 연령, 양돈업 종사기간에 있어서는 유의한 차이는 없었다.

Table 1. Demographic characteristics of the study subjects

Group	No. of subjects	Mean±SD		
		Age(year)	Swine husbandry work duration(year)	Daily work hour in swine husbandry indoors
High endotoxin exposure	5	44.2±12.4	16.8±8.3	5.2±3.3
Low endotoxin exposure	5	40.8±8.2	13.5±8.2	7.8±4.5

2. 말초혈액 면역세포 정량 분석 및 보조 T 림프구 활성화

연구대상자들에게서 얻은 말초혈액 중 1 ml을 이용해 ADVIA2120 혈액 자동 분석기(SMN 10361162, Simens, Germany)를 이용하여 말초혈액성상을 분석하였다. 주요 분석항목으로는 총 백혈구수, 적혈구수, 림프구수, 단핵구 수, 호산구 수, 호중구 수, 호염구 수, 상피 면역세포 구성비(%), 헤마토크리트(%), 헤모글로빈 농도(g/dl)등 이었다. 5 ml의 혈액에서 Ficoll-paque density gradient centrifugation(Amersham Pharmacia Biotech, Upsala, Sweden)방법에 의해 림프구를 분리하였다. 분리된 림프구는 DPBS(BioWhittaker, Walkersville, Maryland, USA)로 세척 후 Complete RPMI 세포배양액(1 mM nonessential amino acids, 1 mM sodium pyruvate, 1% sodium bicarbonate, 2 mM glutamine, 50 μ M 2-mercaptoethanol, 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin-fungizone mixture 첨가)을 이용하여 24 well plate에 well 당 1×10^6 cells을 넣고 5% CO₂ 배양기에서 48시간 활성화 배양 하였다. T 림프구 활성화 물질로는 PMA(phorbol 12-myristate 13-acetate; 5 ng/ 1×10^6 cells; Sigma, Saint Louis, Missouri, USA)와 ionomycin(500 ng/ 1×10^6 cells; Sigma)을 혼합하여 사용하였다.

3. ELISA 방법에 의한 cytokine 정량

세포배양액에 생성된 IL-4, interferon gamma(IFN γ), TNF α , interleukin-12(IL-12), interleukin-13(IL-13)을 정량하기 위해 sandwich enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) 방법을 사용하였다. Immulon IV plate (Dynatech, Chantilly, VA, USA)에 각 cytokine에 대한 capture antibody(2 μ g/ml) 100 μ l/well을 넣고 4℃에서 overnight 정치시켰다. 다음날 automatic washer (Biotek ELx 50, Biotek Instruments, Burlington, VT, USA)로 세척한 뒤, 단백질의 비특이적 부착을 억제

하기 위해 10% FBS(fetal bovine serum)-PBS를(200 μ l/well) 넣고 2시간 실온에서 정치시켰다. 정치후 다시 세척하고 세포배양액과 각 cytokine standard를 넣은 뒤 4℃에서 overnight 정치시켰다. 다음날 7회 세척후 detection antibody(1 μ g/ml) 100 μ l/well을 넣고 실온에서 2시간 정치시킨 다음, 다시 7회 세척 후 avidin-peroxidase(2.5 μ g/ml) 100 μ l/well을 넣고 1시간 실온에서 정치시켰다. 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid; Sigma)를 사용하여 발색 후 흡광도를 405 nm에서 ELISA reader(Biotek EL800, Biotek Instruments)로 측정하였다. cytokine별 사용된 antibody pair의 경우 IL-4, IFN γ , TNF α , IL-13은 BD PharMingen (San Diego, CA, USA)에서 IL-12는 Invitrogen (Camarillo, CA, USA)에서 구입하였다. 각 cytokine 별 정량한계는 다음과 같다: IL-4(15 pg/ml), IFN γ (100 pg/ml), TNF α (60 pg/ml), IL-12(20 pg/ml), IL-13(100 pg/ml).

4. 분진 측정 및 분진내 내독소 정량

분진 포집은 연구 대상 양돈 농장의 비육돈사에서 시행되었다. 작업자들의 호흡기 위치를 고려하여 돈사 중앙 1.5 m 정도 높이에 분진 포집기를 고정시킨 뒤 8시간 포집하였다. 총분진은 미국산업안전보건연구원(National Institute for Occupational Safety and Health, NIOSH) 공정시험법 0600을 호흡성분진은 동기관 공정시험법 0500을 준용하여 측정하였다. Dessicator에서 건조시킨 37 mm PVC여지(pore size 5.0 μ m, SKC, USA)를 총분진 측정을 위해서는 2단 카세트홀더에, 호흡성분진 측정을 위해서는 Nylone cyclone(10 mm nylon dorr-oliver cyclone, SKC, USA)에 각각 장착시켰다. 분진 포집에 사용된 펌프 (Aircheck Sampler Model 224-52, SKC, USA)는 총분진의 경우 2.0 liter/minute로, 호흡성분진의 경우는 1.7 liter/minute의 유속으로 보정하였다. 무게 측정이

끝난 여지는 내독소 정량 분석을 위하여 -20°C 냉동고에 보관하였다.

내독소 수준은 Limulus Amebocyte Lysate(LAL) Kinetic QCL 시험법을 이용한 분석키트(Lonza, Walkersville, MD, USA)를 사용하여 분석하였다(Sykes et al., 2011). 여지를 Tween-20가 0.05% 함유된 pyrogen free LAL water 3 ml에 넣고 1시간 동안 500 rpm에서 교반시킨 다음 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 뒤 상등액 2 ml을 채취하였다. 이 상등액 100 μl 를 96-well microplate에 넣고 30분간 37°C microbiology incubator에 정치시켰다. 이후 100 μl 의 Kinetic-QCL reagent(amebocyte lysate와 발색단 함유)를 넣고 50분간 200 rpm에서 교반시킨 뒤 LAL Reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 내독소 수준은 EU/m^3 으로 환산하여 나타내었다.

5. 통계처리

내독소 고농도 노출군과 저농도 노출군간 연구 대상자들의 연령, 작업력, 분진 및 분진내 내독소 수준, 사이토카인 생성 수준, 말초혈액내 구성 면역세포 수의 차이는 SigmaPlot 및 SigmaStat 통계프로그램(SPSS, Chicago, USA)을 이용하여 통계적 유의성을 검토하였다. 일차적으로 자료의 정규분포 여부를 검증한 뒤 정규분포를 하는 경우에는 Student's *t*-test 검정을 실시하였고, 비정규분포를 하는 경우에는 Mann-Whitney Rank Sum test를 실시하였다. Pearson Product Moment Correlation 분석을 이용하여 분진 및 내독소 수준, 말초혈액 구성 각 면역세포 수, 각종 사이토카인 수준간 상관계수 및 유의성을 분석하였다. *p*-value가 0.05이하일 때를 유의한 차이 또는 상관성으로 판정하였다.

III. 결 과

1. 돈사의 밀폐형태 및 돈사내 작업시간

양돈 농업인들의 돈사내 분진 또는 내독소 노출에 따른 호흡기 알레르기 관련 면역기능의 변화에 영향을 미칠 수 있는 인구학적, 환경적 변수로는 해당 농업인들의 연령, 양돈업 종사 기간, 돈사내 작업시간, 돈사의 밀폐 형태, 사료공급 자동/수동 여부, 돈사내 배설물 제거 방식 등 다양한 변수가 있다. 이미 연구방법

에서 기술하였듯이 고농도 내독소 노출군과 저농도 노출군간 연령, 양돈업 종사 기간에서는 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 1). 분진, 내독소 노출에 영향을 미칠 수 있는 또다른 주요 변수로 돈사내 작업시간을 비교하였다. 돈사 내에서 수행되는 작업 유형으로는 돈사 내 시설 관리, 사료 급여, 자돈 돌보기, 배설물 청소 등이 있는데 이러한 작업들을 행하면서 돈사내에 머무는 시간이 내독소 고농도 노출군에(5.2 ± 3.3 시간) 비해 저농도 노출군에서(7.8 ± 4.5 시간)으로 약간 길었지만 유의한 차이는 아니었다(Table 1). 다음으로 돈사의 밀폐 정도가 축사내 작업동안 분진 노출에 영향을 줄 수 있는 주요 변수로 고려되어 조사하였다. 우리나라 양돈업계에서는 모든, 자돈의 경우 완전 밀폐되고 강제환기장치가 설치되어 있는 무창돈사에 사육하고 육성돈, 비육돈의 경우 동절기인 11월~4월 사이에는 측면을 폐쇄하고 나머지 기간 동안에는 돈사의 측면을 창문 형태로 개방하고 자연환기에 의존하는 개방돈사에 사육하는 형태가 주를 이루고 있다. 7~8월 조사 시기에 연구 대상이 되었던 10개 양돈 농장 비육돈사는 저농도 내독소 노출군에 속하는 1개 농장만이 무창돈사였고 나머지 9개 농장은 개방돈사 형태로 저농도/고농도 내독소 노출군간 의미있는 사육형태의 차이는 없었다.

2. 돈사 내 노출 분진 및 내독소 수준

충분진 및 호흡성분진 수준 모두 고농도 내독소 노출군에서 저농도 노출군에 비해 약 3배 정도 높은 수준을 보였으나 통계적으로는 유의하지 않았다(Table 2). 노출 내독소 수준의 경우 충분진에서 고농도 내독소 노출군의 평균이 $109.35 \text{ EU}/\text{m}^3$ 로 저농도 내독소 노출군의 $0.95 \text{ EU}/\text{m}^3$ 에 비해 100배 이상 높았으며 통계적으로도 유의한 차이를 보였다. 고농도 내독소 노출군에 속하는 돈사 5곳 중에서 2곳에서 호흡기계 염증이 야기될 수 있다고 보고되고 있는 $100 \text{ EU}/\text{m}^3$ 을 초과하는 내독소 수준을 나타내었다. 호흡성분진내 내독소 수준의 경우도 충분진내 내독소 수준과 비슷한 경향을 보여 고농도 내독소 노출군이 저농도 내독소 노출군에 비해 평균적으로 5배 이상의 높은 내독소 수준을 보였으며 이러한 차이는 통계적으로도 유의하였다. 그러나 충분진내 내독소 수준에 비하면 현저하게 낮은 수준으로 고농도 내독

Table 2. Level of endotoxin in total or respirable dust collected from swine farms

	GM(GSD)*		Statistical significance (<i>p</i> value)
	High endotoxin exposure group	Low endotoxin exposure group	
Total dust(mg/m ³)	0.53(2.88)	0.21(13.50)	
Respirable dust(mg/m ³)	0.73(1.23)	0.24(9.04)	
Endotoxin in total dust(EU/m ³)	109.35(4.75)	0.95(8.04)	0.008
Endotoxin in respirable dust(EU/m ³)	1.20(4.19)	0.24(2.01)	0.036

* GM: geometric mean, GSD: geometric standard deviation. Level of endotoxin in dust was determined by Limulus Amebocyte Lysate Kinetic QCL method.

소 노출군의 경우 9.36~0.55 EU/m³ 범위로, 저농도 내독소 노출군의 경우 0.0~0.45 EU/m³ 범위의 호흡성 분진내 내독소 수준이 측정되었다.

3. 내독소 수준과 보조 T 림프구 기능간 상관성 분석

T 림프구 특히 보조 T 림프구는 우리 몸의 면역체계의 중심에 있는 세포로서 그 기능은 체내에서 일어나는 거의 모든 면역반응에 관계되어 있을 정도로 다양하고 중요하다(Takato-Kaji et al., 2005; Cannons et al., 2013; Hirahara et al., 2013). 특히 각종 환경유해인자가 T 림프구의 분화, 활성화를 통한 기능에 영향을 주어 체액면역 수준을 비정상적으로 항진시키거나 세포면역 수준은 저하시키는 등의 특성을 갖고 있음이 발표되면서 직업환경보건의학 연구에서도 노출 유해인자와 보조 T 림프구 기능간 상관성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(Kim et al., 2006; Heo et al., 2010).

본 연구에서는 1형 보조 T 림프구(type-1 helper T lymphocyte)에서 생성, 분비되는 싸이토카인인 IFN γ ,

IL-12, TNF α 및 2형 보조 T 림프구에서 생성되는 IL-4, IL-13 싸이토카인의(Abbas et al., 2007) 생성 수준과 분진, 내독소 수준간 상관성을 분석하였다. IL-4, IL-13 생성 수준은 저농도 내독소 노출군에 비해 고농도 노출군에서 높았으며 특히 IL-13의 경우 약 4배 정도 높았고 이는 통계적으로도 유의하였다(Table 3). 반면 1형 보조 T 림프구에서 생성되는 IFN γ , TNF α 수준은 고농도 내독소 노출군에서 낮았다. 1형, 2형 보조 T 림프구들의 활성화에 있어서 편향성을 예측할 수 있는 지표로 배양액에 생성된 IFN γ 수준을 동일 배양액내 IL-4 수준으로 나눈 생성비(Production ratio)를 계산하는데, 이 생성비가 클수록 1형 보조 T 림프구의 활성화가 2형 보조 T 림프구의 활성화에 비해 우세하다는 것으로 판단한다. 축산 농업인들의 말초혈액내 보조 T 림프구를 활성화시킨 본 연구에서는 고농도 내독소 노출군의 평균 생성비가 1.15로 저농도 노출군의 3.09에 비해 낮았다. 또한 IL-4 수준과 충분진내 내독소 수준은 상관계수(Correlation coefficient)가 0.613 이었고($p=0.0595$), IL-13 수준과 충분진내 내독소

Table 3. Comparison of cytokine production levels from peripheral T cells of swine farm workers between high and low endotoxin exposure group

	High endotoxin exposure group	Low endotoxin exposure group	Statistical significance (<i>p</i> value)
Interleukin-4(IL-4, pg/ml)	26.40±6.60	20.22±7.67	
Interferon- γ (IFN γ , ng/ml)	17.67±6.75	25.42±19.05	
IFN γ vs IL-4 ratio	1.15±0.60	3.09±2.38	
Interleukin-13	1.12±0.37	0.37±0.04	0.049
Tumor necrosis factor- α (TNF α , ng/ml)	6.94±4.42	7.88±2.68	
Interleukin-12(IL-12, ng/ml)	2.71±0.61	1.64±0.79	

Peripheral mononuclear cells isolated through Ficoll-density gradient method were stimulated with phorbol 12-myristate 13-acetate and ionomycin for 48 hours in 5% CO₂ incubator. Level of cytokines in the culture supernatants was assessed by a sandwich ELISA method.

수준은 상관계수가 0.93($p=0.001$)으로 유의한 순상관성을 보였다. 이러한 결과들은 내독소 노출 양이 많아짐에 따라 양돈 농업인들에게서 2형 보조 T 림프구의 편향적인 활성화가 진행되고 이에 따라 이들 농업인들에게서 천식, 알레르기성 비염 또는 기관지염과 같은 알레르기성 질환이 발생 혹은 악화될 가능성이 높음을 예측할 수 근거로 판단된다.

말초혈액내 구성 주요 면역세포들의 수를 정량 분석하였을 때 모든 지표치에서 연구대상 농업인 모두 정상 범위에 속하였다(총백혈구: $5.2 \sim 12.4 \times 10^3/\mu\text{l}$, 림프구: $0.9 \sim 5.2 \times 10^3/\mu\text{l}$, 단핵구: $0.16 \sim 1.0 \times 10^3/\mu\text{l}$, 호중구: $1.9 \sim 8.0 \times 10^3/\mu\text{l}$, 호산구: $0.1 \sim 0.8 \times 10^3/\mu\text{l}$, 호염구: $0.1 \sim 0.2 \times 10^3/\mu\text{l}$)(Wyngaarden et al., 1988; UWMC, 2013). 그러나 고농도 내독소 노출군의 경우 모든 면역세포들의 수가 저농도 내독소 노출군에 비해 낮았다(Table 4). 특히 총백혈구 수, 호중구 수, 호산구 수의 저하는 통계적으로도 유의하였다. 연구 대상이 된 양돈 농업인의 평균 연령과 양돈업 종사 년수에 있어서 두 군간 차이가 없었음을 고려할 때 내독소와 같은 돈사 환경내 노출 유해인자가 영향을 미쳤을 가능성을 배제할 수 없겠다.

IV. 고 찰

축산업 작업환경에서 발생하는 유기분진은 호흡기를 통하여 노출시 천식, 알레르기성 비염, 기관지염 등 호흡기 알레르기 질환을 유발하고 심한 경우 만성폐쇄성폐질환(Chronic obstructive pulmonary disease)까지 발생시키는 것으로 알려져 있다(Omland, 2002; Heutelbeck et al., 2009; Cambra-López et al., 2010; Basinas et al., 2012). 유기분진의 구성 성분 중 내독소는 이러한 호흡기계 이상을 가져오는 핵심적인 역할

을 하는 것으로 밝혀지고 있다(Liu, 2002; Portengen et al., 2005; Cambra-López et al., 2010; Basinas et al., 2012). 그러나 아직까지 우리나라를 포함하여 전세계적으로 내독소에 대한 농작업환경노출기준을 설정하고 있는 국가는 없다. 현재까지 Rylander(1997)가 제안한 기준을 준용하여 내독소 노출 관리를 하고 있는데, $100 \text{ EU}/\text{m}^3$ 이상에서 호흡기계 염증이 유발되고 $1000 \text{ EU}/\text{m}^3$ 에서 전신적인 부작용이 초래되기 시작하고 $2000 \text{ EU}/\text{m}^3$ 이상에서는 심각한 폐렴 증상을 초래할 수 있음을 고려하여 통상적인 내독소 노출 관리를 하고 있다. 한편, 농작업이 건설업, 광업과 더불어 3대 위험 직업임에도 불구하고 우리나라에서는 관련 연구가 활발히 진행되고 있지 못하다. 특히 2010년에서 2011년 사이 우리나라 양돈업계를 중심으로한 축산 농가에 재앙으로 여겨졌던 구제역 대유행은 축산업 현장을 통한 연구를 어렵게 하고 있어 양돈 농장 작업 환경 평가 및 관련된 직업성 질환 연구 수행에 어려움이 많다. 이러한 상황 속에서 수행된 본 연구는 우리나라 전체 양돈 농가 중 약 14%를 차지하는 경기도의 3개 시에서(The agriculture, Fisheries, Livestock news, 2012) 협조한 10개 농장, 10인의 양돈 농업인을 대상으로 진행되어 본 연구의 결과를 축산업 전반으로 일반화하는 것은 어렵겠지만 본 연구가 사람에게 대한 실험연구였다는 점에서 추후 본격적이고 체계적인 연구수행을 위한 계기를 제공하는데 의미가 있다고 여겨진다. 연구 대상 양돈 농장들의 분진 수준을 측정한 결과(Table 2) 총분진 및 호흡성분진 수준 모두 우리나라 고용노동부에서 제시하고 있는 기타분진 노출기준인 $10 \text{ mg}/\text{m}^3$ 이나(MOEL, 2013) 미국정부산업위생전문가협회(American Conference of Governmental Industrial Hygienists, ACGIH)에서 비활성화(Inert), 불용성(Insoluble), 난용성(Poorly soluble) 분진에 대한권

Table 4. Comparison of peripheral blood hematology parameters of swine farm workers between high and low endotoxin exposure group

Number of cells($10^3/\mu\text{l}$)	High endotoxin exposure group	Low endotoxin exposure group	Statistical significance (p value)
Total leukocyte	6.07±0.51	8.62±0.82	0.030
Neutrophil	3.28±0.42	4.74±0.52	0.050
Lymphocyte	2.10±0.14	2.96±0.48	
Monocyte	0.37±0.03	0.47±0.05	
Eosinophil	0.14±0.03	0.24±0.03	0.043
Basophil	0.03±0.01	0.04±0.01	

고 기준인 10 mg/m³(총분진), 3 mg/m³(호흡성분진)을 초과하고 있는 농장은 없었다(ACGIH, 2010). 2003년 본 연구진이 경기지역 양돈 농장 14개소를 대상으로 조사한 결과(Yoo et al., 2003) 총분진의 경우 하절기가 0.13~0.64 mg/m³로 동절기 2.0~7.47 mg/m³에 비해 유의하게 낮았으며, 호흡성분진의 경우도 하절기가 0.07~0.47 mg/m³로 동절기 0.11~1.40 mg/m³에 비해 낮았다. 이 결과를 고려하면 2012년 본 연구에서 분진 포집을 돈사의 창이 열려져 있는(개방돈사) 하절기에 실시하였기에 돈사가 밀폐되는 동절기에는 노출 분진 수준이 높아질 것으로 판단된다. 하절기라 하더라도 무창돈사의 경우 돈사내 총분진 수준이 0.98 mg/m³로 보고된 경우나(Kim et al., 2008) 개방돈사의 경우 하절기에 비해 돈사가 밀폐되는 동절기에 총분진 수준이 5~10배 정도 높아짐을 보고한 최근의 연구 결과(Kwon et al., 2013)를 고려하면 본 연구 대상이 되었던 양돈 농장에 대해 추후 동절기 조사를 수행하여 본 연구 결과를 보강할 필요가 있다고 판단된다. 2003년 연구에서 보고한 내독소 수준을 보면 하절기에 총분진내 내독소 수준이 8.60~521.77 EU/m³, 호흡성분진내 내독소 수준이 0.91~905.7 EU/m³였으며, 동절기에는 각각 92.20~5745.40 EU/m³, 2.31~161.66 EU/m³였다. 2012년 본 연구에서도 총분진내 내독소 수준이 0~1198.8 EU/m³, 호흡성분진내 내독소 수준이 0~9.36 EU/m³수준으로 돈사에서 2003년과 비슷한 수준의 내독소에 노출되고 있음을 제시하는 결과로 생각된다.

양돈업에 종사하는 축산 농업인들의 면역기능 변화에 대해서는 본 연구진은 이미 2005년에 초기 연구 결과를 발표한 바 있다(Kim et al., 2005). 이 연구에서 양돈 농업인들의 혈장 IgE 수준, 히스타민 농도 및 말초혈액 T 림프구의 IL-4 및 IL-10 생성 능력이 동일 지역 양계업 농업인들이나 축산업에 종사하지 않는 대조군들에 비해 유의하게 항진되어 있음을 보고하였다. 이처럼 2형 보조 T 림프구의 기능이 1형 보조 T 림프구의 기능에 비해 상대적으로 우세함을 반영하는 결과는 이번 2012년 연구에서도 확인할 수 있었다(Table 3). 총분진내 내독소 수준이 20 EU/m³ 이상인 고농도 내독소 노출군의 T 림프구로부터의 IL-4, IL-13 생성 수준이 10 EU/m³ 미만 저농도 내독소 노출군에 비해 높았던 반면 1형 보조 T 림프구에

서 생성되는 IFN γ , TNF α 수준은 고농도 내독소 노출군의 경우가 저농도 내독소 노출군보다 낮았다는 연구 결과, 특히 IL-4의 IFN γ 에 대비한 상대적 생성비가 고농도 내독소 노출군에서 저농도 노출군보다 높았다는 점은 양돈 농업인들의 면역체계가 2형 보조 T 림프구의 편향적 활성화되고 있음을 제시하는 결과이다. 이러한 결과는 양돈 농업인들의 경우 2형 보조 T 림프구로부터 IL-4의 생성이 증가하여 B 림프구에서 IgE의 isotype switching 유도가 촉진되고, IgE 수준 증가는 비만세포, 호산구, 호염구들의 IgE 수용체 결합 증가로 이어지고 그 결과 히스타민 분비가 항진되면서 알레르기 증상 발현의 빈도수 혹은 위증도가 높아질 수 있다는 연쇄적인 면역 항진 기전을 설명할 수 있는 근거에 핵심이라 할 수 있겠다(Iversen et al., 2000; Radon et al., 2000; Portengen et al., 2005; Elholm et al., 2010).

내독소 노출이 알레르기성 호흡기질환의 발생이나 악화에 기여하는 기전에 있어서 노출 시기가 중요하다는 가설이 있다. 즉, 어린시절에 노출되면 1형 보조 T 림프구를 활성화시켜 2형 보조 T 림프구 활성화를 억제하여 천식과 같은 알레르기성 호흡기질환 발생을 억제하는 반면, 성인 시기에 노출되면 2형 보조 T 림프구 활성화에 따른 알레르기반응을 촉발시킨다는 것이다(Liu, 2002). 이러한 노출시기의 차이에 따른 면역반응의 양극화에 대한 정확한 원인은 현재까지 밝혀져 있지 않다. 본 연구에서도 성인 양돈 농업인을 대상으로 하였을 때 내독소 수준과 IL-4, IL-13 사이토카인 수준간 유의한 순상관성을 보여 내독소 노출과 알레르기 면역반응의 원인적 연관성을 확인할 수 있었다. IL-4, IL-13 모두 2형 보조 T 림프구, 비만세포, 호산구, 호염구 등 알레르기반응 관련 세포들에서 주로 생성된 후 B 림프구의 IgE isotype switching을 유도하고 비만세포, 호산구, 호염구들을 활성화시켜 히스타민 등 알레르기 증상을 직접적으로 유도하는 매개체 분비를 촉진시킨다(Akdis et al., 2011). 이런 점에서 이들 사이토카인 생성 항진은 성인들의 면역체계를 천식, 아토피성 피부염, 아나필락시스 등 1형 과민반응(type 1 hypersensitivity)에 감수성이 높은 체질로 변화시킬 것이다. 결론적으로 본 연구에서 도출된 양돈 농업인들의 내독소 노출과 연관된 면역기능의 변화는 체계적인 임상검사와 역학조사를 보완함

으로써 양돈 농업인들의 호흡기계 알레르기질환의 이환 가능성에 대한 배경기전으로 확인될 수 있을 것이다.

V. 결 론

본 연구는 돈사에서 노출되는 내독소 수준에 따라 보조 T 림프구가 핵심이 되는 세포면역력에 변화가 있는지를 평가하기 위하여 수행하였다. 경기도 일원에 위치한 10개 돈사에서 충분진, 호흡성 분진을 포집한 뒤 분진량과 분진내 내독소 수준을 정량하였다. 아울러 해당 돈사에서 작업하는 축산 농업인들로 부터 말초혈액을 채취한 뒤, 구성 주요 면역세포의 양적 분석과 더불어 T 림프구를 활성화한 후 생성되는 각종 사이토카인 수준을 평가하였다. 충분진내 내독소 수준이 20 EU/m³ 이상인 경우를 고농도 내독소 노출군으로, 10 EU/m³ 미만인 경우를 저농도 내독소 노출군으로 분류하여 비교하였을 때, 2형 보조 T 림프구에서 생성되는 IL-4, IL-13 사이토카인 수준은 고농도 내독소 노출군에서 저농도 노출군에 비해 상대적으로 높았었고, 1형 보조 T 림프구에서 생성되는 IFN γ , TNF α 수준은 고농도 내독소 노출군에서 저농도 노출군에 비해 상대적으로 낮았었다. 또한 IL-4, IL-13 생성 수준과 내독소 수준은 유의한 순상관성을 나타내었다. 연구 대상자 수가 많지 않아 내독소 노출 수준과 호흡기 알레르기 관련 T 림프구 기능 변화간 명확한 결론을 도출하기는 어렵겠지만 본 연구 결과는 양돈 축산인들이 돈사에서 노출되는 내독소 수준과 이들 축산인들의 면역체계가 천식 등 호흡기 알레르기 과민반응 발현 방향으로 치우칠 가능성 사이에는 상관성이 있음을 보여준 것으로서 국내에서 처음 보고되는 것이다.

감사의 말씀

본 연구는 농촌진흥청 국가 농업 R&D 어젠다사업 연구비(과제번호: PJ00867806) 지원으로 수행되었으며, 연구 수행에 도움을 주신 김승환 가람동물병원장, 엑스피 바이오 이원형 대표이사, 선진 (주) 이생근 이사, 최미경 간호사, 김은미 임상병리사께 감사드립니다.

References

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology, 6th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007. p. 441-462
- ACGIH. TLVs[®] and BEIs[®], Cincinnati: The American Conference of Governmental Industrial Hygienists; 2010. p. 74
- Akdis M, Burgler S, Cramer R, Eiwegger T, Fujita H et al. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : receptors, functions, and roles in diseases. J Allergy Clin Immunol 2011;127:701-721
- Basinas I, Sigsgaard T, Heederik D, Takai H, Omland Ø et al. Exposure to inhalable dust and endotoxin among Danish livestock farmers: results from the SUS cohort study. J Environ Monit 2012;14(2):604-614
- Cambra-López M, Aarnink AJA, Zhao Y, Calvert S, Torres AG. Airborne particulate matter from livestock production systems: a review of an air pollution problem. Environ Poll 2010;158:1-17
- Cannons JL, Lu KT, Schwartzberg PL. T follicular helper T cell diversity and plasticity. Trends Immunol 2013;34(5):200-207
- Elholm G, Omland Ø, Schlünssen V, Hjort C, Basinas I et al. The cohort study of young Danish farmers-a longitudinal study of the health effects of farming exposure. Clin Epidemiol 2010;2:45-50
- Heo Y, Kim HA. Strategy for exposure and risk assessment of occupational hazards related with agriculture including economic animal husbandry. Rural Life Sci 2003;24(4):55-61.
- Heo Y, Lee SH, Kim SH, Lee SH, Kim AH. Public Facility workers' immunological characteristics involved with development of respiratory allergic diseases in Korea. Industrial Health 2010;48: 171-177
- Heutelbeck ARR, Junghans C, Esselmann H, Hallier E, Schulz TG. Exposure to allergens of different cattle breeds and their relevance in occupational allergy. Int Arch Occup Environ Health 2009;82:1123-1131
- Hirahara K, Poholek A, Vahedi G, Laurence A, Kanno Y et al. Mechanisms underlying helper T-cell plasticity: implications for immune-mediated disease. J Allergy Clin Immunol 2013;131:1276-1287
- Iversen M, Kirychuk S, Drost H, Jacobson L. Human health effects of dust exposure in animal confinement buildings. J Agric Saf Health 2000;6(4):283-288
- Kim HA, Lee KS, Kim KR, Kim KH, Heo Y. Immunologic alteration demonstrated at the economic animal husbandry workers. J Toxicol Pub

- Health 2005;21(2):121-128
- Kim HA, Heo YJ, Lee SH, Kim SH, Heo Y. No potential role of genetic polymorphisms for IL-4, IL-13, and IL-receptor in respiratory allergy: A study in adults working at social welfare facilities in Korea. *Journal of UOEH* 2006;28(4):1-11
- Kim JY, Kim KH, Hwang SR, Yeo KW, Kim HA et al. Immunological assessemnt of respiratory allergy status for the swine farm workers in Gyeonggi province of Korea. *J Korean Soc Occup Environ Hyg* 2012;22(4):309-315
- Kim KY, Ko HJ, Kim CN. Assessment fo dust reduction in the enclosed pig building by spraying method with liquid additives. *J Lives Hous Env* 2008;14(2):97-104
- Kimman T, Hoek M, de Jong MCM. Assessing and controlling health risks from animal husbandry. *NJAS-Wageningen J Life Sci* 2013;66:7-14
- Kwon KS, Lee IB, Hwang HS, Ha TH, Ha JS et al., Measurement and analysis of dust concentration in a fattening pig house considering respiratory welfare of pig farmers. *J Kor Soc Agri Eng* 2013;55(5): 25-35
- Liu. A.H. (2002): Endotoxin exposure in allergy and asthma: reconciling a paradox. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 109, 379-392
- MOEL. Exposure limit for chemical and physical hazards. Notification No. 2013-38 of Ministry of Employment and Labor
- Ommand Ø. Exposure and respiratory health in farming in temperate zones-a review of the literature. *Ann Agric Environ Med* 2002;9:119-136
- Portengen L, Preller L, Tielen M, Doekes G, Heederik D. Endotoxin exposure and atopic sensitization in adult pig farmers. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115(4):797-802
- Radon K, Garz S, Schottky A, Koops F, Hartung J et al. Lung function and work-related exposure in pig farmers with respiratory symptoms. *J Occup Environ Med* 2000;42;814-820
- Rylander R. Evaluation of the risks in endotoxin exposures. *Int J Occup Environ Health* 1997;3 (Suppl):s32-s36
- Sykes P, Morris RHK, Allen JA, Wildsmith JD et al. Workers' exposure to dust, endotoxin and β -(1-3) glucan at four large-scale composting facilities. *Waste Manag* 2011;31:423-430
- Takato-Kaji R, Totsuka M, Ise W, Nishikawa M, Hachimura S et al. T-cell receptor antagonist modifies cytokine secretion profile of naive CD4+ T cells and their differentiation into type-1 and type-2 helper T cells. *Immunol Let* 2005;96:39-45
- Tuchscherer M, Kanitz E, Puppe B, Tuchscherer A, Stabenow B. Effects of postnatal social isolation on hormonal and immune responses of pigs to an acute endotoxin challenge. *Physiol Behav* 2004;82: 503-511
- Tweedell A, Mulligan KX, Mertel JE, Chueh FY. Metabolic response to endotoxin in vivo in the conscious mouse: role of interleukin-6. *Met Clin Exp* 2011;60:92-98
- UWMC. Peripheral blood:reference ranges. 2013. University of Washington Medical Center
- Wyngaarden JB, Smith LH, Bennett JC. Cecil Textbook of Medicine, 19th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1988. p. 2370-2380
- Yoo DH, Kim HA, Heo Y, Sung JH, Lee HK et al. Concentration of dusts and endotoxin in swine confinement buildings. *Korean Soc Occup Environ Hyg* 2003;13(1):45-52