

한국산 백석면이 랫드의 폐 기능에 미치는 영향 평가 연구

정용현* · 강민구 · 한정희

산업안전보건연구원 독성연구팀

Effect of Korean Chrysotile on the Lung Function of Rats

Yong Hyun Chung*, Min Gu Kang, Jeong Hee Han

Toxicity Research Team, Occupational Safety and Health Research Institute,
Korea Occupational Safety and Health Agency

ABSTRACT

Objectives: To evaluate the pulmonary toxicity of Korean Chrysotile(KC), the lung function and the number of fibers in the bronchoalveolar lavage fluid of Sprague-Dawley rats instilled with KC were estimated.

Materials: Rats were administered 1 mg KC by a single intratracheal instillation. At each time point(5 days, 5 weeks, 10 weeks), the lung function of the rats was analyzed by pressure transducer and the amount of asbestos in the bronchoalveolar lavage fluid of the rats was calculated by transmission electron microscope equipped with energy dispersive X-ray spectrometer.

Results: The lung function of the rats at 5 days after instillation of KC was confirmed to be degraded. However, after 5 weeks the test groups showed a tendency to recover lung function. Still, after 10 weeks the lung function of the test groups had not recovered completely. The number of fibers in the bronchoalveolar lavage fluid of the rats instilled with KC rapidly decreased. At 5 weeks the number of fibers had reduced to approximately 1/2 of that found at 5 days. Over time, at 10 weeks it had rapidly decreased to 1/100 that found at 5 days.

Conclusions: Korean chrysotile fibers rapidly decreased in the lungs of rats, but the lung function of rats instilled KC does had not completely recovered by 10 weeks.

Key words : Bronchoalveolar lavage fluid, Korean Chrysotile, lung function, rat

I. 서 론

석면에 의한 대표적인 질환인 석면폐증은 연간 석면 누적수 25~200 fibers/ml 정도이면 나타날 수 있지만(De & Gevenois, 2002), 임상적으로는 20년 이상의 잠복기를 가진다(Roggli et al., 2010). 미국에서 석면사를 취급한 근로자에 대한 조사에서는 석면에 연간 20 fibers/ml 이상 노출되면 석면폐증을 발견할 수 있다고 하였다(Green et al., 1997).

우리나라도 석면 취급 기간이 50년이 넘어서면서

석면에 의한 건강 장애가 사회적 문제로 대두되어 산업안전보건법, 석면피해구제법, 석면안전관리법 등 석면 관련법이 제정되어 시행되고 있다. 2011년 1월부터 시행되고 있는 석면피해구제법에 의하여 석면 피해를 인정받은 자(2011년 1월~2014년 3월 현재)는 총 1,344명(악성중피종 666명, 폐암 115명, 석면폐증 563명)이고(KEC, 2014), 고용노동부에서 인정한 석면에 의한 산업재해 피해자(2000년~2012년)는 150명이다(MoEL, 2014). 석면에 의한 질환은 악성중피종, 폐암, 석면폐증 등으로 폐 조직에 염증과 섬유화를 유

*Corresponding author: Yong Hyun Chung, Tel: +82-42-869-0344, E-mail: chungyh59@gmail.com

Toxicity Research Team, Occupational Safety and Health Research Institute, Korea Occupational Safety and Health Agency, 339-30 Expo-ro, Yuseong-gu, Daejeon, 305-380, Korea

Received: April 4, 2014, Revised: May 15, 2014, Accepted: May 22, 2014

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

발하고 폐 기능을 저하시키는 증상을 보이게 된다.

그러나 석면은 종류에 따라 물리화학적 특성이 다르고 석면의 물리화학적 특성에 따라 호흡기에 미치는 영향은 달라질 수 있다(Bernstein et al., 2013). 우리나라에서 사용되었던 석면은 대부분 캐나다에서 수입된 백석면이지만, 우리나라에서도 1930년대부터 석면광상이 개발되어 1945년도에는 전국적으로 석면광상이 28개가 있었고, 1971년부터 1999년까지 94,321 톤의 석면이 국내에서 생산된 바 있으나 (Chung et al., 2013), 국내산 석면에 대한 유해성연구는 거의 없는 실정이다.

본 연구는 한국산 백석면의 유해성을 평가하기 위하여 석면피해구제법에서 제시하고 있는 석면피해인정 평가방법인 기관지 폐포 세정액 내 석면소체 분석법과 폐 기능 측정법을 적용하여 한국산 백석면을 랫드의 기도 내로 주입 한 후, 시간 경과별로 전자현미경으로 기관지 폐포 세정액 내 석면소체 수를 분석하고, 폐 기능 측정기를 사용하여 한국산 백석면이 폐 기능에 미치는 영향을 평가하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시험물질

시험물질로는 석면 생산량이 많았던 충청남도 일원의 석면광장에서 수집한 백석면을 잘게 갈아서 멸균하여 사용하였다. 시험물질로 사용된 백석면(평균 크기 $0.08 \mu\text{m} \times 4.39 \mu\text{m}$)의 mg 당 섬유수는 $59,043 \times 10^6$ fibers 이었으며 백석면의 크기 분포는 직경이 $0.25 \mu\text{m}$ 미만이 99%, 길이가 $5 \mu\text{m}$ 이상이 33% 였다.

2. 시험동물 및 사육환경

시험동물은 특정병원체 부재동물(Specific pathogen free, SPF) Sprague Dawley 수컷 7주령 랫드를 중앙실험동물(주)에서 분양받아 청정 동물실에서 7일간 순화시킨 후 건강한 동물을 선별하여 사용하였다. 시험동물 군구성은 체중을 지표로 하여 군별 체중편차가 최소화 되도록 하여 대조군(생리식염수 투여군)과 1 mg 투여군 등으로 구성하였다. 각 군은 시험물질투여 후 5일차군 10마리, 시험물질 투여 후 5주차군 10마리, 시험물질 투여 후 10일차군 10마리 등으로 구성하였다.

동물사육실은 온도 $22 \pm 3^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 20\%$, 환기회수 13~18회/hr, 조명시간 12시간(오전 9시~오후 9시) 및 조도 150 ~ 300 lux로 설정되었으며, 사료는 방사선 멸균된 실험동물용 고형사료(Labdiet 5053, PMI)를 구입하여 자유롭게 섭취시켰다. 물은 미세여과기 및 자외선을 이용하여 여과시킨 상수도를 자유로이 섭취시켰다.

3. 투여경로 및 투여방법

각 시험동물은 Ketamin(Yuhan, Korea)으로 마취한 후 시험동물의 기도내(Intratracheal instillation)로 시험물질을 1회 투여하였다. 시험물질의 용량은 Bellmann et al.,(1997)의 시험방법을 고려하여 시험군에 백석면 1 mg을 생리식염수(Saline) 0.3 ml로 희석하여 투여하였고, 대조군에는 생리식염수만 투여하였다.

4. 폐 기능검사

폐 기능검사는 시험물질 투여 후 5일차, 5주차, 10주차에 호흡능 측정장치(MAX1320, Buxco Electronics, Sharon, CT)에 의해 서로 연결되어 있고 일정 유량(2.0 ~ 2.5 lpm)으로 흐르는 Whole Body Plethysmograph (SFT3816, Buxco Electronics, Sharon, CT)에 각 시험동물을 넣고 40분간 안정화시킨 후 분당 호흡횟수, 1회 호흡량, 분당 호흡량 등을 측정하였다.

5. 기관지 폐포 세정액 내 석면 관찰

1) 기관지 폐포 세척

시험물질을 시험동물의 기도내로 1회 투여한 후 5일차, 5주차, 10주차에 각 군 중 5마리를 기관지 폐포 세정액 검사용으로 사용하였다.

기관지 폐포 세정액(Bronchoalveolar lavage fluid, BAL)은 각 시험동물의 기관지를 절개한 후 PBS(Calcium- and magnesium-free phosphate buffer solution, pH 7.4) 3 ml로 시험동물의 호흡기계를 총 6회 세척하여 수집하였다.

2) 기관지 폐포 세정액 내 석면 관찰

(1) 광학현미경 관찰

시험동물로부터 수집된 BAL 세정액은 원심분리(2,000 RPM, 10 Min.)하여 3 ml만 남기고 상층액을 제거하였다. 남은 BAL 세정액 3 ml에 물 5 ml를 추가하

여 8 ml로 만든 후 다시 원심분리(2,000 RPM, 10 Min.)하여 상층액을 제거하고 3 ml만 남겼다. 남은 3 ml를 균질하게 교반한 후 100 μ l를 취하여 슬라이드에서 1 시간 건조한 후 Cytospin(1,500 RPM, 10 Min.)으로 처리한 후 H & E(Hematoxylin & Eosin) 염색하여 광학현미경(microscopy, AXIOSKOP2 plus, ZEISS)으로 관찰하였다.

(2) 전자현미경 관찰 및 분석

기관지 폐포 세정액을 원심 분리한 3 ml 중 2 ml를 취하여 투과전자현미경용 시료를 제작하여 투과전자현미경(Transmission electron microscopy, HITACHI H-7100FA, Japan)으로 석면수를 측정하였다.

6. 통계처리

폐 기능검사 결과는 평균과 표준편차로 표시하였으며, 시험물질 투여 후 5일차, 5주차, 10주차 등 시간경과별 측정치에 대한 평균시간의 차이에 대한 유의성 검정은 SPSS 18.0(IBM, USA) 프로그램을 사용하여 one-way ANOVA test 후 Dunnett's test를 실시하거나 Kruskal-Wallis ANOVA test 후 Dunnett's test를 실시하여 통계적 유의성을 검정하였다.

III. 연구결과

1. 폐 기능검사

시험물질 투여 후 5일, 5주, 10주 등 시간 경과별 로 시험동물에 대한 폐 기능을 측정하여 대조군과

비교하였다(Table 1).

5일차의 투여군의 폐 기능은 대조군에 비하여 1회 호흡량은 변화가 없었으나 분당 호흡횟수($p<0.01$)가 유의하게 증가하여 분당 호흡량이 증가하는 경향을 보였다.

5주차의 투여군은 대조군에 비하여 1회 호흡량은 변화가 없었으나 분당 호흡횟수가 다소 증가하여 분당 호흡량이 증가하는 경향을 보였으나 유의한 변화는 아니었다.

10주차의 투여군은 대조군과 분당호흡횟수는 비슷하였으나 1회 호흡량이 다소 줄어들어 분당 호흡량이 감소하는 경향을 보였으나 유의한 변화는 아니었다.

1) 분당 호흡횟수(Frequency)

투여군의 분당호흡횟수(Figure 1)는 투여 후 5일차($p<0.01$)에서는 유의하게 증가하였다. 투여 후 5주차와 투여 후 10주차에서도 증가하는 경향을 보였으나 유의성은 없었다.

2) 1회 호흡량(Tidal volume)

투여군의 1회 호흡량(Figure 2)은 시험물질 투여 후 5일차, 5주차, 10주차 등 모든 시험기간에서 유의한 변화가 없었다.

3) 분당 호흡량(Minute volume)

투여군의 분당호흡량(Figure 3)은 투여 후 5일차에서는 증가하는 경향을 보였으나 유의성은 없었다. 투여 후 5주차와 10주차에서도 유의한 변화는 없었다.

Table 1. Lung function test of rat after Korean chrysotile instillation

Time point	Parameter	Control group (Mean \pm SD)	Chrysotile 1 mg group
5 Days	F(BPM)	100.58 \pm 5.6	133.98 \pm 11.74*
	TV(ml)	0.29 \pm 0.04	0.29 \pm 0.06
	MV(ml/min)	28.47 \pm 5.30	36.99 \pm 5.51
5 Weeks	F(BPM)	102.00 \pm 4.67	106.14 \pm 12.74
	TV(ml)	0.39 \pm 0.02	0.40 \pm 0.05
	MV(ml/min)	38.47 \pm 3.93	41.24 \pm 3.06
10 Weeks	F(BPM)	93.96 \pm 9.36	100.2 \pm 9.65
	TV(ml)	0.41 \pm 0.05	0.36 \pm 0.06
	MV(ml/min)	37.67 \pm 3.24	34.96 \pm 5.17

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

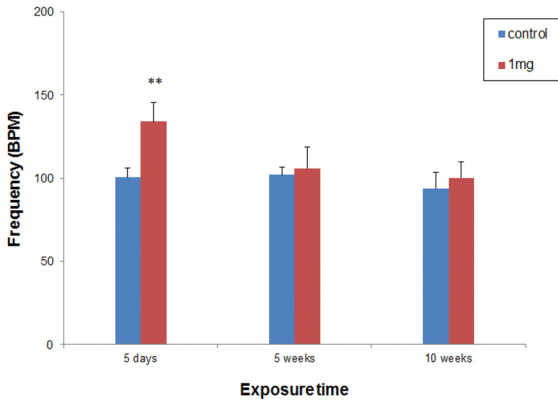


Figure 1. Frequency changes in lung function of rats test after Korean chrysotile instillation
**Significant differences as compared with control ($p<0.01$)

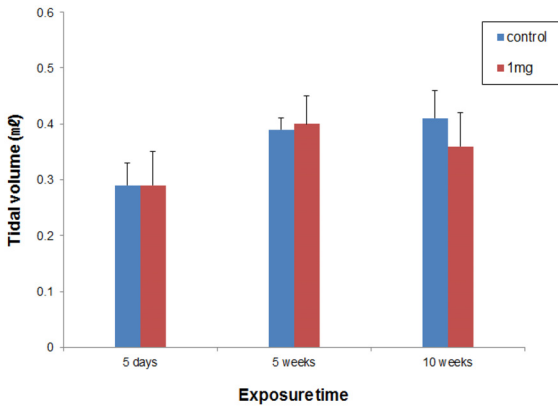


Figure 2. Tidal volume changes in lung function test of rats after Korean chrysotile instillation

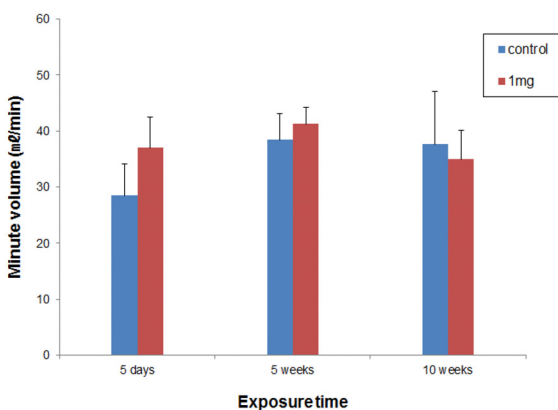


Figure 3. Minute volume changes in lung function test of rats after Korean chrysotile instillation

5. 기관지 폐포 세정액 내 백석면 관찰

1) 광학현미경 관찰

각 시험동물로부터 수집한 세정액을 건조시켜 제작한 슬라이드를 광학현미경으로 검경한 결과(Figure 4), 시험물질 투여 후 5일차, 5주차, 10주차의 모든 시험군의 세정액에서 백석면이 발견되지 않았다.

2) 투과전자현미경 분석

투과전자현미경으로 각 투여군으로부터 수집한 세정액 내 석면 섬유수를 측정된 결과(Table 2), 시험물질 투여 후 5일차에 비하여 5주차에서는 1/2 정도로 줄었고, 투여 후 10주차에서는 1/100 정도로 줄었다.

IV. 고 찰

백석면은 90일 동안 노출되어도 병리 반응이 없으나 각섬석 석면은 폐 속에서 지속적으로 남아 노출 후 5일 후에는 섬유화 반응이 나타나고, 20 μm 이상의 각섬석 석면은 폐 내에서 거의 정화되지 않고 노출 후 1년이 지나도 남아 있다(Bernstein et al., 2005, 2010, 2011). 백석면을 미국 노출기준(Threshold limit value, TLV) 보다 5,000배 이상 많은 양을 노출시킨 랫드의 폐와 흉막강에서는 병리 반응이 나타나지 않았으며, 미국 노출기준보다 14,000배 이상의 농도에 노출된 랫드에서는 가벼운 섬유화가 관찰되었지만, 백석면은 폐에서 빠르게 정화되고 흉막 주위에서는 섬유화가 관찰되지 않았다. 그러나 트레몰라이트, 갈석면 등 각섬석 석면에 5일간 노출시킨 시험동물의 폐에서는 육아종(Granuloma)과 염증이 형성되었으며, 폭로 중지 후 28일이 지나서는 섬유화(Interstitial fibrosis, Wagner grade 4)가 관찰되었다(Bernstein et al., 2006).

호흡기계 내의 섬유상 물질의 독성은 섬유상 물질의 형태와 구성 성분 등 물리화학적 영향을 받는다. 본 연구에서는 시험물질에 의한 폐 기능의 변화를 측정하고 기관지 폐포 세정액 내의 석면소체를 확인하기 위하여 랫드의 기도 내로 한국산 백석면(평균직경 0.08 μm , 평균길이 4.39 μm , 섬유수 $59,043 \times 10^6 / \text{mg}$)을 주입하였다. 시험물질에 의하여 폐 기능이 저하되면 일산화탄소 방산 능력저하, 저산소증이 나타나게 되어 호흡이 빨라지게 되지만, 폐 기능 이상에 대한

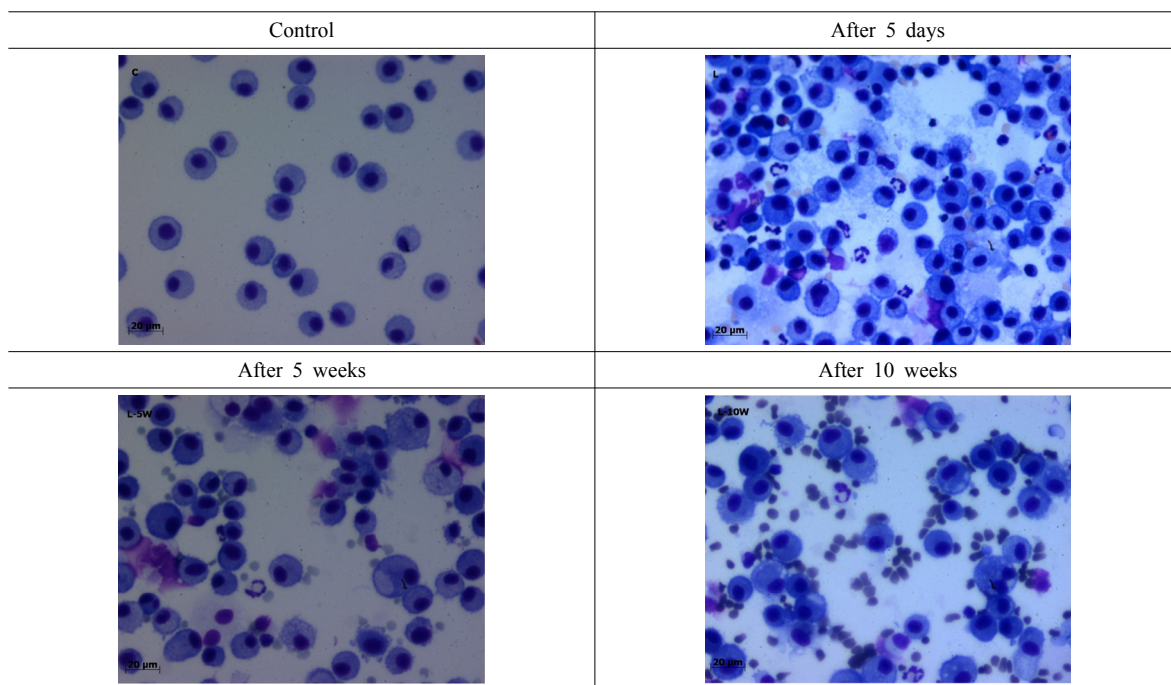
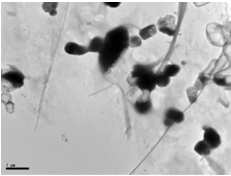
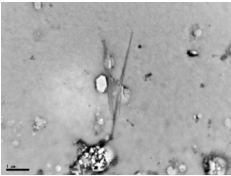
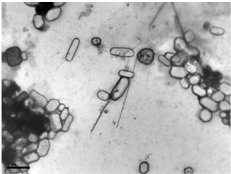


Figure 4. Bronchoalveolar lavage fluid of the rat after the instillation with Korean chrysotile 1 mg(HE staining, X 400, light microscopy), No asbestos was observed in this microscopy

Table 2. Changes of fibers concentration(fibers/mL) and Chrysotile image from bronchoalveolar lavage fluid of rats instilled with Korean chrysotile 1 mg with transmission electron microscopy

	Chrysotile 1 mg group ($\times 10^3$ fibers/mL)	Chrysotile image ($\times 10,000$)
After 5 days	2370.10 \pm 2115.01*	
After 5 weeks	1132.60 \pm 1386.22†	
After 10 weeks	21.50 \pm 15.72†	

* All values are expressed as Mean \pm SD

† Significant differences as compared with control : $p < 0.05$

검사는 특이성(Specificity)이나 민감성(Sensitivity)이 낮아서 참고치의 범위가 넓다(De & Gevenois, 2002). 본 연구에서 시험동물의 폐 기능을 평가하기 위하여 분당호흡횟수를 측정한 결과, 시험물질을 투여 후 5일차에는 분당호흡횟수가 유의하게 증가하여 폐 기능이 저하된 것을 확인할 수 있었다. 시험물질 투여 후 5주차에서는 분당호흡횟수가 증가하는 경향을 보였지만 유의한 변화는 아니었고 5일차에 비하여 폐 기능이 회복되는 경향을 보였다. 시험물질 투여 후 10주차에서도 대조군에 비하여 분당호흡횟수가 증가하는 경향을 보여 폐 기능이 완전히 회복되지는 않은 것으로 판단되었다.

광학현미경으로 기관지 폐포 세정액 내의 섬유를 관찰한 결과에서는 시험동물의 폐 조직 내에서 섬유를 관찰하기 어려웠다. 이러한 결과는 백석면은 폐 내의 산(Acid) 환경에서 안정적이지 않고, 폐 조직 내에서 빠르게 용해되고, 광학현미경은 직경이 0.25 μm 보다 큰 섬유만 관찰할 수 있으나 백석면의 직경은 대부분 0.25 μm 보다 작고, 쉽게 짧은 섬유로 쪼개져서 대식세포에 탐식되어(Hume & Rimstidt, 1992) 광학현미경으로는 관찰하기 어려웠던 것으로 판단되었다.

투과전자현미경으로 기관지 폐포 세정액 내 석면을 관찰한 결과에서는 5일차에 비하여 시험물질 투여 후 5주차에서는 1/2 정도로 감소하고 10주차에서는 1/100 정도로 감소하여 백석면 투여 후 시간이 경과됨에 따라 폐 조직 내 백석면의 수는 급격하게 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 현상은 폐 조직 공간에 떠 있는 백석면은 대식세포에 의하여 탐식되거나 폐액의 산(pH 4.5 내외)에 영향을 받아 생체 내에서 시간이 경과됨에 따라 용해되어 나타나는 현상으로 판단되었다.

V. 결 론

한국산 백석면을 랫드의 기도 내로 1회 투여한 후 시간 경과별로 시험동물의 폐 기능의 변화를 측정한 결과, 시험물질 투여 후 5일차부터 폐 기능이 저하된 것을 확인할 수 있었고, 5주차 이후 회복되는 경향을 보였으나 10주차에도 완전히 회복되지는 않았다. 기관지 폐포 세정액 내의 백석면의 수를 전자현미경으

로 관찰한 결과에서는 시험물질 투여 후 5일차에 비하여 5주차에서는 1/2 정도로 감소하고 10주차에서는 1/100 정도로 급속히 감소하여 한국산 백석면은 각섬석에 비하여 상대적으로 생체내구성이 약하다고 판단되었다. 그러나 광학현미경으로는 기관지 폐포 세정액 내에서 석면을 관찰할 수는 없어서 광학현미경으로 폐포 세정액 내 석면소체를 계수하여 석면피해를 인정하는 시험법을 석면피해구제법에 적용하기 위해서는 표준화된 시험법의 개발이 필요하다고 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
- Bernstein DM, Dunnigan J, Hesterberg T, Brown R, Velasco JA et al. Health risk of chrysotile revisited *Crit Rev Toxicol* 2013 Feb;43(2):154-83
- Bernstein DM, Chevalier J, Smith P. Comparison of Calidria chrysotile asbestos to pure tremolite: final results of the inhalation biopersistence and histopathology following short term exposure. *Inhal Toxicol* 2005;17:427-49
- Bernstein DM, Rogers RA, Smith P, Chevalier J. The toxicological response of Brazilian chrysotile asbestos: a multidose sub-chronic 90 d inhalation toxicology study with 92 day recovery to assess cellular and pathological response. *Inhal Toxicol* 2006;18:313-32
- Bernstein DM, Rogers RA, Sepulveda R, Donaldson K, Schuler D et al. The pathological response and fate in the lung and pleura of chrysotile in combination with fine particles compared to amosite asbestos following short term inhalation exposure-interim results. *Inhal Toxicol* 2010;22:937-62
- Bernstein DM, Rogers RA, Sepulveda R, Donaldson K, Schuler D et al. Quantification of the pathological response and fate in the lung and pleura of chrysotile in combination with fine particles compared to amosite-asbestos following short-term inhalation exposure. *Inhal Toxicol* 2011;23:372-91
- Chung YH, Han JH, Kang MK. Dose-response assessment and physicochemical characteristics on Korean chrysotile. *Occupational Safety & Health Research*

- Institute; 2013. p. 3
- De Vuyst P, Gevenois PA. Asbestosis. In: Hendrick DJ, Burge PS, Beckett WS, Churg A, eds. Occupational Disorders of the Lung: Recognition, Management, and Prevention. London, England: Saunders; 2002:143 - 162
- Green FH, Harley R, Vallyathan V, Althouse R, Fick G et al. Exposure and mineralogical correlates of pulmonary fibrosis in chrysotile asbestos workers. *Occup Environ Med* 1997;54(8):549 - 559
- Hume LA, Rimstidt JD. The biodegradability of chrysotile. *Am Mineral* 1992; 77(9 - 0):1125 - 1128
- Korea environment corporation, asbestos damage relief center. 2014; <https://www.env-relief.or.kr:444/arms/main/main.jsp>
- Ministry of Employment and Labor. 2014; <http://www.moel.go.kr/>
- Roggli VL, Gibbs AR, Attanoos R, Churg A, Popper H et al. Pathology of asbestosis- An update of the diagnostic criteria: Report of the asbestosis committee of the college of american pathologists and pulmonary pathology society. *Arch Pathol Lab Med* 2010 Mar;134(3):462-80