

## 한국산 백석면의 랫드의 폐 내 변화 연구

정용현\* · 한정희

산업안전보건연구원 독성연구팀

## Evaluation of Biodurability of Korean Chrysotile within The Lung of Rats

Yong Hyun Chung\* · Jeong Hee Han

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

### ABSTRACT

**Objectives:** To evaluate the biodurability of Korean Chrysotile(KC), the changes in fibers numbers and changes in the element composition of fibers from the lung of Sprague-Dawley rats instilled KC(average size 4.74  $\mu\text{m}$ ,  $59,043 \times 10^6$  fibers/mg) was estimated.

**Methods:** Rats were administered 1 mg KC(low group) or 2 mg KC(high group) by a single intratracheal instillation. At each time point(5 days, 5 weeks, 10 weeks), the numbers of KC fibers and the changes of element composition(atomic %) of KC fibers from the lung of the rats were analyzed with transmission electron microscope equipped with energy dispersive X-ray spectrometer.

**Results:** Over time, the number of fibers within the lungs of animals were reduced.

The average length of the low and high group is significantly reduced from 5 days after administration. Over time, the fiber ratio of at least 5  $\mu\text{m}$  remaining in the lung tissue of the low concentration group was up but the high group was reduced. From day 5 after administration, the composition ratio(Mg) was significantly decreased in all groups.

**Conclusions:** Size and composition of Korean Chrysotile in the lung tissue of rats was changed from 5 days.

**Key words:** biodurability, Korean Chrysotile, rat, transmission electron microscope equipped with energy dispersive X-ray spectrometer

## I. 서 론

석면은 종류에 따라 물리화학적 특성이 다르며 생체 내에서 내구성도 다르다. 또한 동일한 석면이라도 섬유상 물질의 길이와 생체에 노출된 양이나 노출 기간에 따라 유해성은 달라질 수 있다. 백석면은 90일 동안 노출되어도 폐 조직에 병리 반응이 나타나지 않았으나 각섬석 석면은 폐 속에서 지속적으로 남아 폭로 후 5일 후부터 섬유화 반응이 나타나는 것으로 알려졌다(Bernstein et al., 2005; 2010; 2011). 백

석면은 생체내구성이 약하여 폐 실질 내 축적된 후 용해되어 인체에서의 반감기는 수 주에서 몇 개월로 평가되었다(Churg & Wright, 1994). 각섬석계 석면은 폐 내에서 조각이 나지 않고 화학적 공격에 민감하지 않아 랫드에 흡입된 갈석면(200 fibers/cm)의 반감기는 400일 이상이었으며(Hesterberg et al., 1998), 인체 내에서 각섬석 반감기는 수 십 년으로 알려져 있다(Churg & Wright, 1994). 캐나다산 백석면의 반감기는 11일로 알려져 있다(Bernstein et al., 2003).

본 연구는 아직 연구가 부족한 한국산 백석면에

\*Corresponding author: Yong Hyun Chung, Tel:042-869-0344, 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: November 11, 2014, Revised: January 12, 2015, Accepted: January 26, 2015

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.

대한 유해성평가 기초 자료를 생산하기 위하여 한국산 백석면의 크기와 밀리그램(mg)당 섬유수 및 구성 성분 등 물리 화학적 특성을 분석한 후 랫드의 기도로 주입하여 시간 경과별로 폐 조직 그램(g)당 섬유상 물질의 수와 섬유상 물질의 크기 변화 그리고 섬유상 물질의 구성성분 변화를 기도로 주입하기 전과 비교 평가하여 한국산 백석면의 폐 조직 내에서의 물리 화학적 변화 양상을 평가하기 위하여 수행하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시험물질

충청남도 일원의 석면광상에서 수집한 백석면을 마쇄하여 시험물질로 사용하였다. 시험물질로 사용된 국내산 백석면의 평균 크기는  $0.08 \mu\text{m} \times 4.74 \mu\text{m}$  이었다. 시험물질의 직경은  $0.25 \mu\text{m}$  미만이 99% 이었고, 시험물질의 길이는  $5 \mu\text{m}$  이상이 33%이었다. 백석면의 구성 원소비율은 Mg(57.51%), Si(47.57%), Fe(0.93%) 이었다. 시험물질로 사용된 국내산 백석면의 형태는 Table 1과 같이 가늘고 긴 전형적인 백석면의 형태를 보였으며, 시험물질의 밀리그램(mg)당 섬유수는  $59,043 \times 10^6$ 이었다.

### 2. 시험동물 및 사육환경

시험동물은 특정병원체 부재동물(Specific pathogen free, SPF) SD(Sprague Dawley) 수컷 7주령 랫드를

중앙실험동물(주)에서 분양받아 청정 동물실에서 7일간 순화시킨 후 건강한 동물을 선별하여 사용하였다. 시험동물 군구성은 군별 체중편차가 최소화 되도록 하여 대조군(생리식염수 투여군), 저농도군(1 mg 투여군), 고농도군(2 mg 투여군) 등으로 구성하였다. 각 시험군은 시험물질투여 후 5일차군 5마리, 시험물질 투여 후 5주차군 5마리, 시험물질 투여 후 10주차군 5마리 등으로 구성하였다.

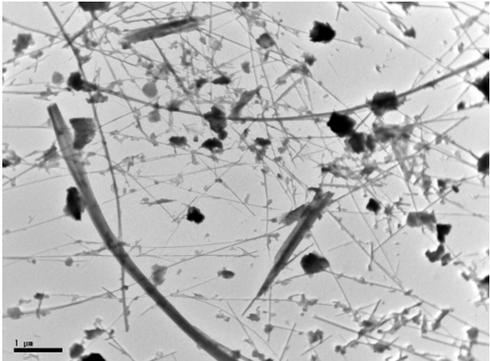
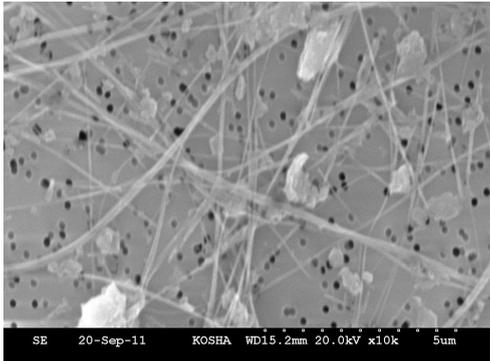
### 3. 투여경로 및 투여방법

각 시험동물은 Zoletil(Virvac, USA)과 Rumpun (Bayer, Germany)으로 마취한 후 시험동물의 기도(Intratracheal instillation)로 시험물질을 1회 투여하였다. 저농도군에는 백석면 1 mg을 생리식염수(Saline) 0.3 ml로 희석하여 투여하였으며, 고농도군에는 백석면 2 mg을 생리식염수 0.3 ml로 희석하여 투여하였다. 대조군에는 생리식염수만 투여하였다.

### 4. 폐 조직 내 석면 분석

시험물질 투여 후 5일차, 5주차, 10주차에 절취한 오른쪽 폐 조직을 동결건조기(Ilsin, Korea)에서 하룻밤 건조시킨 다음, 폐 무게를 측정하고 저온회화로(Low temperature plasma asher, Yamato, Japan)에서 12시간 동안 회화시켰다. 회화된 폐 조직은 증류수에 넣어 필터(Millipore GTTP 02500, nuclepore filter, pore size  $0.2 \mu\text{m}$ , diameter 25 mm)로 여과하여 건조한 후 진공증착기(EMITECH, 950X. UK)로 탄소막을

Table 1. Fiber numbers(fibers/mg) and TEM and SEM image of Korean chrysotile ore,  $\times 10,000$

Fiber numbers ( $\times 10^6$ fibers/mg)	TEM* $\times 10,000$	SEM† $\times 10,000$
59,043		

\* = transmission electron microscopy, † = scanning electron microscopy

입힌 후 carbon coated nickel grid(EMS, diameter 3 mm, 200 mesh) 위에 올려놓고 chloroform vapor로 12시간 동안 용해한 후 건조하였다. 제작된 각 시험동물의 폐 조직 시료는 EDS(Energy Dispersive X-ray Spectrometer, HORIBA, EX200, UK)가 장착된 투과전자현미경(transmission electron microscopy, TEM, H-7100FA, HITACHI, Japan)로 각 시험동물의 건조

폐 1그램(g) 당 섬유수를 계수하고, 20개의 석면을 선정하여 크기(길이, 직경)를 측정하고 구성성분을 분석하였다.

5. 통계처리

폐 내 섬유상 물질의 수, 길이, 직경, 구성 성분 분석 등의 결과는 평균과 표준편차로 표시하였으며, 시

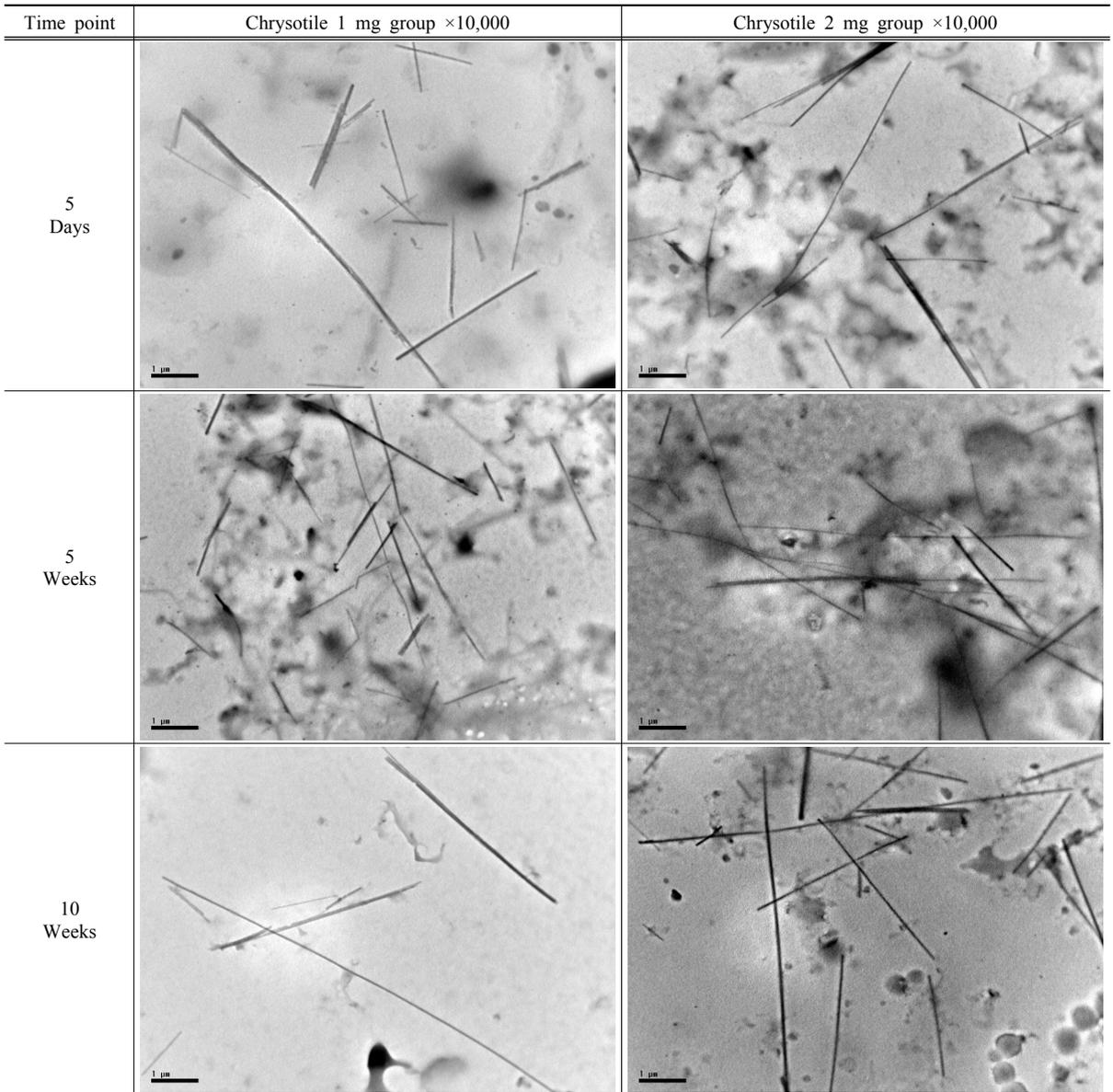


Figure 1. TEM image of fibers in the lung of rats after Korean chrysotile instillation

**Table 2.** Changes of fibers numbers from lung of rats instilled Korean chrysotile

Time point	Chrysotile 1 mg group ( $\times 10^6$ fibers/g)	Chrysotile 2 mg group ( $\times 10^6$ fibers/g)
5 Days	6,356 $\pm$ 6543	10,207 $\pm$ 4399
5 Weeks	6,688 $\pm$ 2706	5,246 $\pm$ 1168
10 Weeks	2,132 $\pm$ 901	7,500 $\pm$ 4191

All values are expressed as Mean  $\pm$  SD

험물질 투여 후 5일차, 5주차, 10주차 등 시간경과별 측정치에 대한 평균치간의 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 조직 내 백석면 섬유수 분석

시험물질 투여 후 시간 경과별로 각 시험동물의 폐 조직 1 g 당 섬유수를 관찰한 결과(Table 2, Figure 1), 저농도군은 시험물질 투여 후 5일차( $6,355.9 \times 10^6$ )에 비하여 5주차( $6,688 \times 10^6$ )는 큰 변화가 없었으나, 시험물질 투여 후 10주차( $2,132 \times 10^6$ )에서는 5일차에 비하여 1/3 정도로 줄어들었다.

고농도군에서는 시험물질 투여 후 5일차( $10,207 \times 10^6$ )에 비하여 5주차( $5,246 \times 10^6$ )에서는 1/2정도로 줄어들었으나 10주차( $7,500 \times 10^6$ )에서는 5주차와 큰 차이가 없었다.

#### 2. 폐 조직 내 백석면의 크기 변화 분석

시험동물의 폐 조직 내에 남아있는 시험물질의 크

기를 분석한 결과(Table 3), 저농도군에서는 시험동물의 기도로 투여하기 전의 평균길이( $4.74 \mu\text{m}$ )에 비하여 투여 후 5일차( $2.01 \mu\text{m}$ )와 5주차( $2.50 \mu\text{m}$ )는 유의하게 줄었으며, 10주차( $3.22 \mu\text{m}$ )에서도 줄어드는 경향을 보였다. 시험물질 투여 후 5주, 10주 등 시간이 경과됨에 따라 생체 내에 남아있는 섬유상 물질의 평균길이는 늘어나는 경향을 보였다.

고농도군의 평균길이도 시험물질 투여 후 5일차( $2.74 \mu\text{m}$ ), 5주차( $2.70 \mu\text{m}$ ), 10주차( $2.80 \mu\text{m}$ ) 등으로 시험물질을 시험동물에 투여 전에 비하여 유의하게 길이는 줄었다. 시험물질 투여 후 5주, 10주 등 시간이 경과됨에 따라 생체 내에 남아있는 섬유상 물질의 평균길이는 저농도군에 비하여 변화가 적었다.

시험물질의 평균직경도 시험동물에 투여하기 전에 비하여 모든 저농도군과 고농도군에서 감소하는 경향을 보였지만, 시험물질 투여 후 5주, 10주 등 시간이 경과됨에 따라 생체 내에 남아있는 섬유상 물질의 평균직경은 변화가 없었다.

#### 3. 폐 조직 내 백석면 크기 분포 분석

시험동물의 폐 조직에 남아있는 길이  $5 \mu\text{m}$  이상의 섬유상 물질의 분포를 분석한 결과(Table 4), 저농도군에서는 시험동물의 기도로 투여 전에는 33%였으나 시험물질 투여 후 5일차는 6%, 5주차는 12%, 10주차는 17% 등으로 시험물질 투여 후 시간이 경과함에 따라 길이  $5 \mu\text{m}$  이상이 남아있는 비율이 올라갔다.

고농도군에서는 시험물질 투여 후 폐 조직에 남아있는 길이  $5 \mu\text{m}$  이상의 섬유 분포는 5일차는 13%, 5주차는 11%, 10주차는 10% 등으로 시험물질 투여 후 시간이 경과함에 따라 길이  $5 \mu\text{m}$  이상이 남아있는 비율이 줄어들었다.

**Table 3.** Changes of length( $\mu\text{m}$ ) and diameter( $\mu\text{m}$ ) of fibers from lung of rats instilled with Korean chrysotile

Time point	Chrysotile 1 mg group		Chrysotile 2 mg group	
	length( $\mu\text{m}$ )	diameter( $\mu\text{m}$ )	length( $\mu\text{m}$ )	diameter( $\mu\text{m}$ )
Before (N=100)	4.74 $\pm$ 5.00	0.08 $\pm$ 0.05	4.74 $\pm$ 5.00	0.08 $\pm$ 0.05
5 Days (N=100)	2.01 $\pm$ 1.88*	0.05 $\pm$ 0.03*	2.74 $\pm$ 4.28*	0.06 $\pm$ 0.29*
5 Weeks (N=100)	2.50 $\pm$ 2.83*	0.05 $\pm$ 0.03*	2.70 $\pm$ 3.44*	0.04 $\pm$ 0.03*
10 Weeks (N=100)	3.22 $\pm$ 3.42	0.05 $\pm$ 0.04*	2.80 $\pm$ 3.74*	0.04 $\pm$ 0.10*

All values are expressed as Mean  $\pm$  SD

Significant differences as compared with control : \* p < 0.05

**Table 4.** Size distribution(%) of fibers from lung of rats instilled with Korean chrysotile

Time point	Chrysotile 1 mg group		Chrysotile 2 mg group	
	5 < ( $\mu\text{m}$ )	5 $\geq$ ( $\mu\text{m}$ )	5 < ( $\mu\text{m}$ )	5 $\geq$ ( $\mu\text{m}$ )
Before (N=100)	67	33	67	33
5 Days (N=100)	94	6	87	13
5 Weeks (N=100)	88	12	89	11
10 Weeks (N=100)	83	17	90	10

**Table 5.** Changes of element composition(atomic %) of fibers from lung of rats instilled Korean chrysotile

Time point	Chrysotile 1 mg group			Chrysotile 2 mg group		
	Mg	Si	Fe	Mg	Si	Fe
Before N=20	57.51 $\pm$ 0.86	41.57 $\pm$ 0.85	0.93 $\pm$ 0.19	57.51 $\pm$ 0.86	41.57 $\pm$ 0.85	0.93 $\pm$ 0.19
5 Days N=20	54.02 $\pm$ 3.42*	44.91 $\pm$ 3.43	1.08 $\pm$ 0.63	54.69 $\pm$ 1.63*	43.73 $\pm$ 1.59	1.58 $\pm$ 0.82
5 Weeks N=20	54.65 $\pm$ 3.50*	43.38 $\pm$ 3.80	1.97 $\pm$ 1.56	55.47 $\pm$ 2.76*	43.34 $\pm$ 2.81	1.19 $\pm$ 0.81
10 Weeks N=20	56.17 $\pm$ 1.74	42.26 $\pm$ 1.85	1.57 $\pm$ 0.87	53.88 $\pm$ 2.69*	44.53 $\pm$ 2.90	1.59 $\pm$ 0.85

All values are expressed as Mean  $\pm$  SD

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

#### 4. 폐 조직 내 백석면의 성분비율 변화 분석

국내산 백석면을 기도내로 투여한 후 시간경과별로 폐 조직 내의 백석면의 구성성분(Mg) 비율 변화를 투여 전의 백석면 구성성분(Mg)과 비교하여 유의성을 평가한 결과(Table 5), 저농도군의 Mg 성분은 투여 후 5일차부터 유의한 감소를 보였으며(p<0.01) 5주차에서도 유의한 감소를 보였다(p<0.01). 10주차에서도 감소하는 경향을 보였다. 고농도군의 Mg 성분은 5일차와 5주차 그리고 10주차에서 모두 유의한 감소를 보였다(p<0.01).

## IV. 고 찰

폐 조직 내의 백석면은 형태, 농도 등에 영향을 받기 때문에 폐 조직 내의 백석면 수와 노출된 백석면 수는 일관성 있는 상관성을 보이지는 않는다(Roggli et al., 2010). 백석면은 바깥쪽의 실리카 층(Silica layer)과 안쪽의 수산화마그네슘층(Magnesium hydroxide layer)으로 이루어진 규산염으로 폐 조직 내 대식세포의 산(Acid, pH 4 ~ 4.5) 환경에 노출되면 결정체로부터 마그네슘이 해리되어 백석면 섬유는 부서져서 작은 조각으로 된다(Cressey & Whittaker, 1993). 본 연구에서 국내산 백석면(평균길이 4.74  $\mu\text{m}$ , 길이 5  $\mu\text{m}$  이상 33%,

mg 당 섬유수 59,043  $\times$  10<sup>6</sup>)을 시험동물의 기도로 투여한 후 시간 경과에 따라 폐 조직 내 섬유상 물질의 변화를 관찰한 결과, 폐 조직 내의 백석면의 마그네슘(Mg) 구성성분 비율은 모든 군에서 시험물질 투여 후 5일차부터 유의한 감소를 보여 국내산 백석면은 생체 내에서 5일차부터 유의한 감소가 관찰되었다.

산에 약한 백석면은 산에 의하여 다공성의 비결정형 수산화 실리카(Non-crystalline hydrated silica)로 되어 쉽게 짧은 조각으로 갈라지며, 심하게 산의 공격을 받게 되면 녹게 된다(Suquet, 1989). 폐액(Lung fluid)과 성상이 비슷한 Gamble 액 내에 백석면을 넣어 두면 백석면의 길이는 현저히 줄어들어 10주차에서는 작은 섬유들만이 남는다(Osmon-McLeod et al., 2011). 본 연구에서도 폐조직 내 섬유수는 저농도군에서는 시험물질 투여 후 5일차에 비하여 5주차에는 변화가 없었으나 10주차에 1/3 정도로 줄어들었고, 고농도군에서는 5일차에 비하여 5주차에 1/2 정도로 줄었다. 본 연구에서 폐 조직 내 섬유 수의 감소는 저농도군(투여 후 10주)보다는 고농도군(투여 후 5주)에서 빨리 시작되었으나 시험물질 투여 후 섬유상 물질수의 잔존율(투여 후 5일차 섬유수/투여 후 10주차 섬유수)은 저농도군(33.5%)에 비하여 고농도군(73.5%)이 2배 정도 높았다. 이러한 연구 결과로

고농도로 생체 내로 투여된 섬유상 물질은 저농도로 생체 내로 투여될 때 보다 빠르게 생체 내 탐식반응이 일어나지만, 생체 내 제거작용은 저농도로 투여될 때 보다 느린 것으로 판단되었다.

본 연구에서 시험동물의 폐 조직 내에 남아있는 시험물질의 크기를 분석한 결과에서는 시험물질 투여 후 5주, 10주 등 시간이 경과됨에 따라 생체 내에 남아있는 섬유상 물질의 평균길이는 늘어나는 경향을 보였다. 이러한 결과는 저농도군에서는 시험물질 투여 후 5주, 10주 등 시간이 경과됨에 따라 시험물질 중 길이가 5  $\mu\text{m}$  미만의 섬유상 물질은 빨리 녹고 5  $\mu\text{m}$  이상의 섬유상 물질은 천천히 녹아 폐 조직 내에 남아있는 5  $\mu\text{m}$  이상의 섬유상 물질의 비율은 높아져서 생긴 현상으로 판단되었다. 고농도군의 폐 조직 내 남아있는 섬유상 물질도 저농도군과 같은 경향을 보였으나 저농도군에 비하여 상대적으로 변화율은 적었다. 이러한 결과는 Chung et al. (2012)이 산에 강한 각섬석 석면인 국내산 안소필라이트(Anthrophyllite)를 랫드의 기도로 투여한 후 1주, 2주 4주 등 시간 경과별로 폐 조직에서 섬유상 물질을 관찰한 결과에서는 본 연구와 반대로 시간이 경과될수록 생체 내에 남아있는 섬유상 물질의 평균 길이는 줄어들고 남아있는 5  $\mu\text{m}$  이상의 섬유상 물질의 비율이 낮았으나, 동일한 시험방법으로 국내산 백석면을 랫드의 기도로 투여한 후 폐 조직에서 섬유상 물질을 관찰한 결과에서는 시간이 경과될수록 생체 내에 남아있는 섬유상 물질의 평균길이는 늘어나고 남아있는 5  $\mu\text{m}$  이상의 섬유상 물질의 비율이 높았던 결과와는 일치하였다. 본 연구는 다른 종류의 석면이나 다른 나라 백석면을 이용한 대조실험 없이 수행되어 석면 종류별로 비교 평가를 할 수 없는 한계점은 있으나, 국내산 백석면이 호흡기로 노출되었을 때 시간 경과별로 생체 내에서 물리화학적 성상변화 정도를 평가하기 위하여 수행되었다. 또한 본 연구에 사용된 시험물질은 크기가 같은 섬유상 물질을 사용하지 않았고 반감기를 평가할 수 있는 시험기간을 고려하지 않았기 때문에 향후 국내산 백석면의 생체 내 반감기를 평가하기 위해서는 시험물질의 크기가 균일하고 생체 반감기를 평가할 수 있는 시간 경과별 평가 기간을 고려한 시험이 수행되어야 할 것으로 판단되었다.

## V. 결 론

한국산 백석면을 랫드의 기도로 1회 투여한 후 시간 경과별로 폐 조직 내에 남아있는 백석면의 물리화학적 특성을 분석한 결과, 한국산 백석면은 5일차부터 화학적 변화가 시작되고, 폐 조직 내 남아있는 섬유수는 시간이 경과됨에 따라 감소하였으나 폐 조직 내에 남아있는 길이 5  $\mu\text{m}$  이상의 섬유상 물질의 잔존율은 높았다. 또한 고농도로 생체 내로 투여된 섬유상 물질은 저농도로 생체 내로 투여될 때 보다 빠르게 생체 내 탐식반응이 일어나지만, 생체 내 제거작용은 저농도로 투여될 때 보다 느린 것으로 판단되었다.

## References

- Bernstein DM, Rogers R, Smith P. The biopersistence of Canadian chrysotile asbestos following inhalation. *Inhal Toxicol* 2003;15(13):1247-1274
- 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, 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 MG, Kim JK, Yang SY. Physicochemical property changes on respiratory system of rats after intratracheal instillation exposure to Korea chrysotile and anthrophyllite. *J Korean Soc Occup Hyg.* 2012;22(3): 224-234
- Churg A, Wright JL. Persistence of natural mineral fibers in human lungs: an overview. *Environ Health Perspect* 1994;102(suppl 5):229-233
- Cressey BA, Whittaker EJW. Five-fold symmetry in chrysotile asbestos revealed by transmission electron microscopy. *Mineral Mag* 1993;57:729-32

Hesterberg TW, Hart GA, Chevalier J, Müller WC, Hamilton RD, et al. The importance of fiber biopersistence and lung dose in determining the chronic inhalation effects of X607, RCF1, and chrysotile asbestos in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998;153: 68-82

Osmond-McLeod MJ, Poland CA, Murphy F, Waddington L, Morris H, et al. Durability and inflammogenic impact of carbon nanotubes compared with asbestos fibres. *Part Fibre Toxicol* 2011;8:15

Rogli 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

Suquet H. Effects of dry grinding and leaching on the crystal structure of chrysotile. *Clays Clay Miner* 1989;37: 439-45