

국외출장 결과보고 요약문

1. 출장개요

- 목 적 : 제38회 미국독성병리학회 심포지엄 참석
- 기 간 : 2019. 6. 22.(토) ~ 6. 28.(금) (7박 5일)
- 대상국가 및 방문기관 : 미국 롤리(롤리 컨벤션 센터)
- 출장자 인적사항 : 안전보건공단 산업안전보건연구원 산업화학연구실
흡입독성연구센터 병리검사부 이용훈 연구위원, 차효근 대리

2. 수행사항

- 학술심포지엄 및 전문가 교육 참석을 통한 최신 국외 독성 분야 정보 수집
- 국외 주요기관 인사 접촉을 통한 인적 네트워크 형성 및 국외 기관 동향 파악
- 포스터 발표(2편) 통한 산업화학연구실에서 수행한 연구 실적 전파
 - Immunohistochemical Characterization of Oxidative Stress in the Lung of Rats Exposed to Humidifier Disinfectant, PHMG • HCl (이용훈 연구위원, 차효근 대리)
 - Two-week Toxicity study of Humidifier disinfectant, PHMG • HCl by Whole Body Inhalation Exposure in Rats (이용훈 연구위원, 차효근 대리)

산업재해예방

안전보건공단

산업안전보건연구원



국외출장 결과 보고

-제38회 미국독성병리학회 심포지엄 참석-

2019. 7. 19.

산업안전보건연구원
산업화학연구실



I. 출장 목적

- 미국독성병리학회(STP, Society of Toxicologic pathology)에서 주최하는 제38회 심포지엄에 참석하여, 산업화학연구실에서 수행한 연구 성과를 발표하고 참가자들과의 교류를 통하여 인적 네트워크를 형성하고 정보교환을 하고자 함
- 또한, 독성병리분야 실무자의 전문 지식을 함양하여 연구 및 전문사업 수행 시 활용하고자 함

※ 심포지엄 개요

- 미국독성병리학회 (STP, Society of Toxicologic pathology)는 1971년 설립된 이래 미국과 캐나다를 중심으로 북미권에서 최고 권위를 인정받고 있고 주기적인 교육, 학회 개최 및 학회지 발간을 통해 세계 독성병리학 분야를 이끌어 가고 있음
- 제 38회 심포지엄 주제는 'Environmental Toxicologic Pathology and One Health'로 사람 및 동물을 아우르는 자연 생태계에서 모든 생물의 건강을 위하여 화학 및 물리적 위험 인자에 대한 탐색, 규정, 기전적 이해, 규제 등과 관련된 최신 접근법을 다루었으며, 대기오염의 독성과 병리학, 직업 환경인자의 독성병리학, 규제 독성병리학의 독성평가 패러다임, 내분비 교란 및 생식 독성병리학, 모든 생물의 건강을 위한 생태연구에서 병리학, 독성병리학과 빅 데이터 기술의 통합 등 모두 6가지 주제로 진행됨
- 교육 코스(Continuing Education Courses)는 심포지엄과 매년 같이 실시하는 전문가 교육프로그램으로 특정 계통장기 또는 독성병리학의 특정주제에 대한 전문 교육을 실시함

II. 출장 개요

- 출장기간 : 2019. 06. 22(토) ~ 06. 28(금) : 5박 7일
- 출 장 지 : 미국 노스캐롤라이나주 롤리(롤리 컨벤션센터)
- 출 장 자 : 병리검사부 이용훈 연구위원 및 차효근 대리 (2인)
- 주관학회 : 미국독성병리학회(Society of Toxicologic Pathology)

III. 출장 세부 일정

일 정	출장지	수 행 내 용
6. 22(토)	인천공항	○ 이동 (인천 → 미국 롤리)
6. 23(일)	롤리 컨벤션 센터	○ 전문가 교육 코스 프로그램 ■ CE I. Data Interpretation, Visualization, and Statistics for Nonclinical Toxicity Studies ■ CE IV. Otic Toxicologic Pathology
6. 24(월) ~6. 26(수)	롤리 컨벤션 센터	○ 심포지엄 참석 ■ Session 1. Toxicology and Pathology of Air Pollution ■ Session 2. Toxicologic Pathology of Workplace Agents ■ Session 3. Toxicity Assessment Paradigms in Regulatory Pathology ■ Session 4. Endocrine Disruption and Reproductive Pathology ■ Session 5. Pathology in Ecological Research with Implications for One Health ■ 포스터발표 : 2건
6. 27(목)~ 6. 28일(금)	미국(롤리)	○ 이동 (미국 롤리 → 인천)

IV. 주요 수행 활동

○ 전문가 교육 주요 내용

- CE 1 : Data Interpretation, Visualization, and Statistics for Nonclinical Toxicity Studies
 - 독성시험의 데이터 시각화 기술 발달 및 기능, 데이터 요구, 오류, 규제에서 고려할 점 및 데이터 시각화의 적용 사례

- 독성 시험에서 임상병리 데이터 통계 해석 시 유의할 점 및 바이오 마커 개발에서 통계 적용 사례
- CE 4 : Otic Toxicologic pathology
 - 귀의 비교 해부학 및 생리학, 균형 감각 기관의 생리학
 - 전임상시험에서 이(Otic) 독성 시험에 대한 고찰, 독성병리학적 평가방법, 규제 관점에서 청각 손실, 이독성 및 적절한 시험 선택의 중요성

○ 심포지엄 섹션 주요 내용

□ Session 1. Toxicology and Pathology of Air Pollution

- Cardiopulmonary Health Effects of Air Pollution
 - 발표자 : Kent E. Pinkerton(University of California Davis)
 - 오존과 입자 물질은 심장에 악영향을 주는 공기 오염원으로, 이런 물질의 독성기전은 농도, 노출 기간, 연령, 성별 등 여러 요소와 관련이 있는 것으로 여겨짐
 - 오존이 심혈관계에 미치는 영향은 신경 및 국소 호흡반응과의 복합작용이며, 입자물질의 악영향은 물리화학적 성질, 축적된 장소, 호흡기와 심혈관계 세포와 상호 작용에 의해 좌우됨
- Susceptibility Variations in Air Pollution Health Effects
 - 발표자 : Urmila P. Kodavanti(US EPA)
 - 사람의 개체 요소와 유전자형은 공기오염원으로 유발된 생물학적 반응을 증가시키거나 감소시키며, 유전자형 외에도 음식, 개체 또는 모체 비만, 당뇨병, 아동기 감염병력, 성별, 정신사회적 또는 모체 스트레스 등이 공기오염원에 대한 선천적 면역 또는 대사 반응에 영향을 미침
 - 일례로, 임신 중 고지방식은 태아에서 전알러지 Th2 표현형

(Pro-allergic Th2 phenotype)을 빨리 발현하게 하였으며, 호흡기세포 융합바이러스(Respiratory syncytial virus)에 대한 인터페론 감마 감수성이 낮은 것과 관련 있음

- 또한, 공기오염원에 의한 신체 악영향 증가는 정신사회적 또는 모체 스트레스 요소가 관련 있는 것으로 알려져 있지만, 최근에는 신경내분비 스트레스 반응과도 연관이 있는 것이 밝혀짐

- Exposure to Ambient Ultrafine Particles as a Risk Factor for Neurodevelopmental Disorders

- 발표자 : Deborah A. Cory-Slechta(University of Rochester School of Medicine)
- 많은 역학조사에서 자폐 스펙트럼 장애(Autism spectrum disorder, ASD)를 포함한 신경발달장애와 공기 오염원 노출이 연관이 있다고 밝히고 있음
- 마우스에서 분만 후(사람에서 임신 3기 뇌 발달에 해당) 초미세먼지 노출이 수컷 마우스에서 뇌실 비대, 뇌량의 크기 감소, 수초화, 혈청 산화 글루타티온, 글루타메이트 및 염증의 증가, 충동적 행동, 사회적 성향 변화를 유발하여 자폐스펙트럼 장애의 모든 특징과 가설 기전이 확인됨
- 또한, 임신기 미세/초미세 먼지 노출(사람 임신 초기 및 중기 뇌 발달 해당)에서도 뇌에서 뇌실 비대, 미성숙하고 크기 큰 뇌량 및 수초화가 유발되나, 초미세 탄소와 연무화된 Lipopolysaccharides의 단독 및 혼합 노출물 및 디젤배출 입자를 노출하였을 때에는 이런 결과가 재현되지 않으며, 미세/초미세 먼지 노출 후에는 뇌에서 Fe 및 S 등 금속이 현저하게 증가함
- 따라서, 산화적 스트레스 및 철과 관련된 세포 사멸과정을 통하여 신경독성이 발생하는 것을 제시함

- New Onset Asthma, Ozone, and Innate Lymphoid Cells: A New Pathogenesis Paradigm
 - 발표자 : Jack R. Harkema(Michigan State University)
 - 아동기의 비염 및 천식이 공기 중 오존과 역학적으로 관련 있음
 - 랫드에서 다른 항원 노출이나 오염원을 동반하지 않고 오존을 노출 하였을 때 비강의 2형 면역과 점액세포 화생을 동반한 호산구성 비염이 유발하는 것이 확인되었으며, 오존에 의해 손상된 상부 호흡기도 변화는 알려지 비염이나 천식과 관련된 전형적인 선천성 면역에서 역할을 하는 T나 B세포가 아닌 2형 선천 림프구세포(IL2s)에 의해 조절되며, 또한, 오존의 반복된 노출이 폐에서도 기도와 유사한 IL2s 매개 2형 면역반응과 병리학적 병변을 유발함
 - 따라서, 공기 중 오존의 일상의 반복적 노출은 민감한 어린이의 코와 폐에서 선천 2형 면역인 비알러르기성 비염과 천식, 호산구성 염증, 점액세포 화생을 유발한다고 제시함

□ Session 2. Toxicologic Pathology of Workplace Agents

- Organic Solvent Neurotoxicity
 - 발표자 : Peter Spencer(Oregon Health & Science University)
 - n-hexane은 섬유, 가구, 및 가죽 제품 세척제 및 제약과 화장품 산업서 유기용제로 많이 사용되고 있는데, 작업장에서 만성적인 과도한 노출로 근로자에게서 말초 축삭 신경병증을 유발하는데 특히, 중국과 인도에서 최근 보고되고 있음
 - n-hexane은 대사가 되면, γ -diketone 유사체인 2,5-hexanedione (2,5-HD)는 원위축삭변성을 유발하며, 또 다른 γ -diketone 유사체 1,2-Diacetylbenzene(1,2-DAB)는 근위 축삭변성을 유발함

- 이런 독성기전은 γ -diketone이 Lysine의 ϵ -amino와 부가체 (Adduct)를 형성하여 Lysine이 풍부한 단백질을 손상시키며, 특히, 신경 미세소관을 구성하는 Stathmin 및 Actin alpha 2가 γ -diketone의 표적단백질로 확인됨
- Rapidly Progressive Pneumoconiosis in Appalachian Coal Miners: Clinical and Pathology Findings
 - 발표자 : Robert Cohen(University of Illinois Chicago)
 - 미국에서는 전현직 광부에서 진폐증의 심한 형태인 괴상성 섬유화 및 급속진행성 진폐증이 증가하고 있음
 - 이런 진폐증 환자의 방사선 및 병리학적 소견에서 진폐증과 결정질 실리카(Crystalline silica)의 호흡기를 통한 과도한 노출 연관성을 제시하였으며, 폐표본 연구에서 괴상성 섬유화 및 급속진행성 진폐증환자의 과거 조직 표본과 현재 조직 표본을 주사전자현미경 및 X-ray 스펙트로미터로 분석한 결과 최근 진폐증 표본에서 결정질 실리카의 비율이 과거 진폐증 표본보다 높아졌음
- Silica, Lupus, and Dietary Omega-3 Fatty Acid Interventions
 - 발표자 : Kathryn Wierenga(Michigan State University)
 - 결정질 실리카(Crystalline silica)와 식이성 오메가-3 지방산인 Docosahexaenoic acid (DHA)는 전신성 홍반성 루프스(Systemic lupus erythematosus)발달과 관련이 있음
 - 루프스 유발 모델인 NZBWF1 마우스에서 비강으로 실리카를 투여 시 면역계 자가면역관용(Self-tolerance) 손실로 자가면역 반응이 유발되며, 폐에서는 이소성 림프구를 형성하였는데, 이소성 림프구는 B세포, T세포, 여포성수상돌기세포, 자가항체를 형성하는 형질세포로 구성되었으며, 이런 이소성 림프구는 자가면역 질환을 촉진시키고, 이어서 사구체신염을 유발하였음

- 흥미로운 사실은, DHA를 투여하였을 때 실리카가 유발하는 이소성 림프조직 형성, 자가면역 진행 및 사구체 신염이 억제 되었음

- Flavorings-Related Lung Disease

- 발표자 : Ann Hubbs(NIOSH)
- 미국에서는 전자레인지 팝콘, 향료 및 커피 생산 작업장에서 일하는 노동자들에게서 폐쇄성 세기관지염이 발생하고 있음
- 휘발성 Alpha-dicarbonyl 화합물, Diacetyl(2,3-butanedione) 및 2,3-pentanedione이 폐쇄성 기관지염과 관계가 있는데, 관련 연구에서는 Diacetyl과 2,3-pentanedione이 많은 분자를 손상시켜 단백질 항상성을 방해하여, 기도 상피괴사를 유발한다고 보고하고 있음
- 랫드에서 만성 노출 시 사람의 폐쇄성 세기관지염과 유사한 기도 섬유화가 유발되었으며, 또한, 최근 흡입시험 결과에서 3-carbon alpha-dicarbonyl 화합물인, Methylglyoxal은 Diacetyl 보다 낮은 농도에서도 상피괴사를 유발하였음
- 버터향료에서 일반적으로 사용하는 혼합물인 Diacetyl, Acetoin 및 Acetic acid를 작업장과 유사한 농도로 랫드에 노출 시, Diacetyl 단독이나 다른 물질과 혼합노출에서 기도 상피괴사가 유발되었지만, Acetic acid나 Acetoin 단독노출에서는 유발되지 않았음

□ Session 3. Toxicity Assessment Paradigms in Regulatory Pathology

- Toxicity Assessment of Food Additives: Myrcene, a Synthetic Flavoring Agent
 - 발표자 : Steve Mog(US FDA)

- Mycercer은 화장품, 비누, 세정제 성분 뿐 만 아니라, 음식 및 음료수에서 감미료로 자주 사용됨
 - 미 FDA에서 지난 해 발표한 Myrcene의 발암성 랫드 시험 결과, 랫드에서 신장 세뇨관 선종/선암종이 유의성 있게 증가하여 신장에서 발암성이 인정되었으며, 수컷은 0, 28, 26, 8%, 암컷은 0, 4, 2, 6%로 수컷보다 암컷이 심하였음
 - 랫드 신장에서 이런 신생물의 유발 기전은 α -2 μ 신증, 만성진행성 신증, 바깥수질 선조 신증과 복합적으로 연관된 것으로 사료됨
- Cell Phone Radiation: Toxicity Assessment of a Physical Agent
- 발표자 : Mark Cesta(NIEHS/NTP)
 - 휴대폰이나 무선 장비는 장비 간 목소리나 메시지 또는 데이터를 전송하기 위해 무선 주파수 방사능(Radio frequency radiation)을 발산하고 이는 일상생활에서 사람에게 노출됨
 - 초기 휴대폰의 주요 신호 변조 기술은 Global system for mobile communications(GSM)과 Code division multiple access(CDMA) 이었음
 - GSM 및 CDMA 무선주파수 방사능의 만성 독성을 평가하기 위해서 태아부터 생후 2년동안 암수 SD 랫드에서 전신노출로 900MHZ로 1.5, 3 및 6 W/kg 무선주파수방사능을 주 7일간 매일 9시간씩 노출하였으며 실험결과, 무선주파수 방사능은 임신기 동안 어미 쥐의 체중감소 및 새끼의 생시체중 감소를 유발하였으나, 새끼의 체중은 몇 주 후 대조군과 유사한 수준으로 체중이 회복되었음
 - GSM 및 CDMA 두 연구 모두에서 수컷에서 많은 개체에서 심장의 신경초종 및 뇌의 악성 신경교종이 확인되었으며, GSM 연구에서는 부신 수질에서 크롬친화성 세포종이 수컷 노출군에서 증가하여 수컷에서만 발암성이 확인되었음

- Risk Assessment Considerations and Chemical-Induced Olfactory Neuronal Loss: Hydrogen Sulfide as a Case Example
 - 발표자 : David C. Dorman(North Carolina State University)
 - 황화수소(H_2S)는 후각신경 손상을 유발하여 사람에서 후각부전 및 후각상실을 유발하고 설치류에서 비강의 병변을 유발함
 - 이런 병변은 흡입노출 참고농도 예측과 가이드라인에 기초가 되는데, 이런 참고농도 추정은 물질이 축적되는 부위, 병리학적 반응, 작용 기전에 근거함
 - 이를 분석하기 위하여 본 연구에서는 생리학적 약물동태 (Physiologically-based pharmacokinetic, PBPK)와 전산유동 분석(Computational fluid dynamics, CFD) 모델을 적용하였는데, 시험결과 황화수소에 의한 후각 상실은 비강에서 기류가 빠른 부분을 따라 나타났으며, Cytochrome oxidase 억제와도 연관되어있는 것으로 확인되었음

- Polyethylene Glycol (PEG): Neurotoxicity Assessment of PEGylated Biologics
 - 발표자 : Deepa B. Rao(US FDA)
 - 폴리에틸렌 글리콜(Polyethylene glycols)은 수용성 복합체로 경구 및 국소 투여에 용제로 이용되고 있으나, 약물의 비경구적 투여(예, 정맥, 피하, 근육 내)에서 폴리에틸렌 글리콜의 전신노출에 대한 안전문제를 고려할 필요가 있음
 - 폴리에틸렌 글리콜과 생약물제와 결합하는 목적은 약물의 반감기를 증가시키는 것으로, 비임상시험에서 폴리에틸렌 글리콜과 결합된 생약물제 투여 시 관찰되는 주된 현미경 소견은 공포화(Vacuolation)인데, 폴리에틸렌 글리콜의 분자량 및 분자 구조가 조직 내 분포 및 공포화 정도에 영향을

미치는 것으로 알려져 있음

- 신경계에서 뇌의 맥락충 상피세포 및 뇌피질의 모세혈관 및 뇌와 척수의 신경절에서 공포화가 관찰되었는데, 면역조직화학법으로 폴리에틸렌 글리콜 축적이 확인되었음
- 예로, Recombinant human IGF-1이 폴리에틸렌 글리콜과 결합된 형태가 결합되지 않은 형태보다 뇌에 축적이 되는 것을 볼 때 혈액-뇌 장벽을 능동수송으로 통과하는 것으로 판단되나, 이런 폴리에틸렌 글리콜축적이 신경 전도속도나 Fluoro-Jade 염색 평가에서 신경의 기능이나 활성화에 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었으며, 육안적인 행동변화를 유발하지 않음

□ Session 4. Endocrine Disruption and Reproductive Pathology

- Antiandrogen Mixology: Cumulative Effects of Environmental Chemicals on Male Rat Reproductive Tract Development

- 발표자 : Justin Conley(US FDA)
- 요도하열, 잠복고환, 정자 수 감소 등 남성 생식기 장애는 지난 수십년 동안 증가 추세에 있으며, 여러 분자 기전을 통해 실험동물에서 재현되었음
- 예를 들어, 안드로젠 수용체 길항제나 몇몇 프탈레이트 (Phthalates) 자궁내 노출은 수컷 생식기관 발달을 저해하지만, 안드로젠 수용체 길항제는 태아 테스토스테론 생산에 영향을 주지 않는 반면, 프탈레이트는 영향을 미침
- 수컷 생식기계 독성 기전은 서로 다른 분자기전을 통해 작용하지만 결국 화학물질이 축적하여 수컷 생식기관 발달에 작용하여 사람과 유사한 악영향을 유발한다고 알려져 있으며, 이런 다양한 독성기전은 여러 다른 화학물질 분자기전 연구를 평가하고 디자인하기 위한 개념 모델인 독성발현경로

(Adverse Outcome Pathway, AOP) 네트워크로 통합될 수 있음

- Reproductive Consequences in Adult Female Mice following Developmental Estrogen Exposure: An ER α -Mediated Estrogen Response

- 발표자 : Wendy Jefferson(NIEHS)
- 에스트로젠성 화학물질 노출은 생식기 기형, 불임 및 암을 유발하는데 ethylstilbestrol(DES)가 태아에 노출되면, 생식기관에서 유전자 표현에 광범위한 변화를 통해 세포분화에 변화를 유발하여 성년이 되었을 때 착상실패와 자궁암이 발생할 수 있음(>90%)
- 자궁 내 DES 노출 태아의 후천 유전성 연구에서 가장 의미 있는 결과는 유전자 차이를 유도하는 촉진자와 ER α dependent histone H3K27ac의 관련성에 관한 연구결과로, 성체에서도 이런 결과를 확인하기 위해서 태아기에 DES에 노출된 성체(지속발정기) 및 대조군(발정휴지기와 발정기)의 자궁에서 RNA-seq와 H3K27ac ChIP-seq를 실시하였을 때 대조군의 발정휴지기와 발정기 사이에서는 4,161개 유전자 발현이 차이가 있었으며, 이는 발정주기 변화와 관련이 있었음
- 반면, 대조군 발정기와 DES 노출군의 지속발정기에서 3,330 개 유전자 발현이 차이가 있었으며, 이는 태아기 DES 노출과 연관 있으며, 특히 성체의 DES 특이적인 자궁 내 유전자 발현 차이 중 40%는 영구적 변화로, 태아기 DES 노출 시에도 확인되는 변화임
- H3K27ac와 ER α ChIP-seq 결과 이런 유전자의 50%에서 H3K27ac 신호가 증가하거나 비정상적인 ER α binding 결합이 확인되므로, 이런 신호는 DES 노출 자궁에서 유전자의 영구적 변화에 역할을 하는 것을 제시함

- Update on Intersex and Endocrine-Induced Reproductive Abnormalities in Fish

- 발표자 : Mac Law(North Carolina State College of Veterinary Medicine)
- 수중환경은 오염물질이 마지막에 침전되는 장소로 경골어류는 사람에 대한 악영향의 감시자뿐 만 아니라, 수중환경과 서식자들에 대한 지표 역할을 함
- 내분비 활성 화합물(Endocrine active compounds, EACs)가 수돗물 뿐 만 아니라 수중생물체에 위협이 증가되고 있는데, 이런 수중환경에서 서식하는 수컷 물고기의 여성화는 내분비 활성 화합물에 대한 바이오 마커로 이용되고 있으며, 특히 고환에서 난모세포존재, 즉 간성으로 이를 확인할 수 있음
- 노스 캐롤라이나 및 사우스 캐롤라이나 20개 강기슭 지역에서 블랙베스와 블루길에서 내분비 활성 화합물 노출과 간성 간의 관계를 확인하였으며, 그 중 Yadkin-Pee Dee 강에서 심도 있는 연구를 진행하였음
- 대조군 및 내분비 활성 화합물 노출 장소에서 화학물질을 물고기 조직, 물, 침전물, 유기체 측정을 통해 확인하였으며, 실험결과, Ethinylestradiol(EE2), 다핵방향족탄화수소(Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) 및 중금속이 기준치 이상으로 확인되었음
- 블랙 베스에서 간성의 정도 및 분포가 심하였으며, 다핵방향족 탄화수소가 간성 발달과 가장 연관 있는 환경 오염물질로 확인되었으며, 일부 화학물질 혼합물도 부가적 또는 상승적인 방식으로 간성에 작용하였음

□ Session 5. Pathology in Ecological Research with Implications for One Health

- Honey Bees and the Four Ps—Pesticides, Pathogens, P-coumaric Acid, and P450s

- 발표자 : May R. Berenbaum(University of Illinois)
- 꽃가루 매개체로서 꿀벌은 미국농업에서 중요한 역할을 하는데 꿀벌 개체 수 감소원인으로 살충제와 병원체 노출이 가능성 있음
- 2006년 게놈 시퀀싱(Genome sequencing) 결과, 꿀벌 유전자 중에서 생체이물 대사와 관련된 Cytochrome P450 유전자와 면역관련 유전자 수가 다른 곤충 보다 감소한 것이 관찰되었으며, 농업 살충제, 곰팡이제거제 등에 의해 악화됨
- 하지만, P-coumaric acid 및 Quercetin 같은 식이 식물화학물질 (Phytochemicals)은 면역과 방어 능력을 향상시키는 유전자를 촉진시켜 꿀벌이 살충제와 병원체에 저항할 수 있게 함

- Integration of Pathology in the Assessment of Adaptation to PAHs in Atlantic Killifish(*Fundulus heteroclitus*)

- 발표자 : David E. Hinton(Duke University)
- 버지니아주 해안지대의 엘리자베스강은 목제소에서 크레스토 사용이 많아 오염이 심하며, 퇴적물에서 100-500 $\mu\text{g/g}$ 로 다환 방향족 탄화수소 혼합물이 가장 많이 축적되어 있는 것으로 보고됨
- 대서양 킬리피쉬(*Fundulus heteroclitus*)는 실험하기에 용이한 어종으로 집단양식과 여러 일생 단계에서 환경 관련 노출 연구가 가능함
- 퇴적물에서 나온 간극수를 킬리 피쉬에 노출 하였을 때 태아 및 성체 조직 검사에서 간극수 노출에 적응된 물고기에서는 배경 병변 이상의 변화가 관찰되었으며, 성체기에는 미세소포 공포화 및 신생물 형성 등 간의 변화, 심장의 판막병증, 심막 내 혈액 유출, 갑상선 증식 등 병변이, 태아기에서는 심막 부종 및 튜브형 심장형성 등 초기형성이 관찰되었음

- Biochemical and Hematologic Changes in 28-Day Rat Studies of Seven Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFAS)—Beyond PFOA and PFOS

- 발표자 : Michelle Cora(NIEHS/NTP)
- 불소화물질 Perfluorinated substances(PFAS), Perfluorobutane sulfonic acid(PFBS), Perfluorohexane sulfonic acid salt (PFHxSK), Perfluorooctanesulfonic acid(PFOS), Perfluorohexanoic acid(PFHxA), Perfluorooctanoic acid(PFOA) Perfluorononanoic acid(PFNA) 및 Perfluorodecanoic acid (PFDA)를 화합물의 작용기와 길이에 따른 상대 독성을 이해하기 위하여 암수 SD랫드에 28일 동안 투여하였음
- 이런 화합물은 얼룩, 기름 및 물에 저항성 있는 생산품(예, 들러 붙지 않는 조리기구, 얼룩 방지 카페트)를 만드는 데 사용되고 윤활제와 소방거품으로도 사용 됨
- 일부를 제외하고는, 임상병리 검사 간수치에서 빌리루빈이나 담즙수치가 증가하고, 글로불린과 트리글리세라이드가 감소 하는 변화가 확인되었으며, PFHxA에서는 재생성 빈혈이 관찰 되었음
- 조직병리학적 검사, 간세포 비대 및 괴사, 골수세포 수 감소 등이 확인되었음

- The Occurrence and Toxicological Effects of Freshwater Cyanobacterial Toxins

- 발표자: Gregory S. Travlos(NIEHS/NTP)
- 남조세균(Cyanobacteria)는 햇빛이 충분한 생태계에서 서식하는 광합성 유기체로, 수온 상승, 영양분 과잉, 즉 질소나 인 농도의 증가는 남조세균의 부영양화와 연관되어 있음
- 녹조 기간 동안, 수많은 남조 세균들이 생활성 화합물(Bioactive

compounds)를 수중으로 직접 분비 하거나, 세포가 죽으면서 분비하는데, 이들 중 많은 수가 척추동물에 독성이 있는 것으로 판명되었으며, 녹조기간 동안 이런 독소는 위험 수준의 유해 녹조(Hazardous Algal Blooms, HABs)를 발생하고, 물고기, 새, 야생동물, 가축, 애완동물 및 사람에게 까지 악영향을 미치는 것으로 잘 알려져 있음

- 이런 민물 남조세균의 가장 혼한 독소는 알칼로이드인 Cylindrospermopsin (CYN) 및 Anatoxin (A-a)와 펩타이드인 Microcystins(MCYSTs)이 있으며, CYN는 여러 장기에 영향을 미치는데, 특히 간의 손상과 출혈을 유발하며, A-a는 신경 독소, MCYSTs는 간 독소로 알려져 있음

○ 포스터 세션(주요내용)

- Three-Dimensional Human Uterine Fibroid Cell Culture for Exploring Molecular Mechanisms of Fibrosis and Nongenomic Signaling by Environmental Estrogens

- 발표자 : Lysandra Castro 등(NIEHS)
- 3차원(3D) 배양시스템은 예측독성과 기전연구에서 활용이 증가하고 있는데, 자궁 횡문근종(자궁 근종)은 자궁근층의 횡문근세포에서 유래하는 양성종양으로 여성 자궁이 점진적으로 섬유화가 되는데 내분비 교란 화학물질 또는 Bisphenol A 나 그 유사체 같은 환경 에스트로젠은 자궁에서 이런 섬유화를 유도함
- 사람 자궁 횡문근 세포(Ht-UtSMC)와 자궁 횡문근종(Ht-UtLM)에서 회전타원체를 만들고 3차원 조직형태를 평가하였는데, 회전타원체를 96-well plates에서 중간엽세포 배양배지를 이용하여 증식시키고 7일 후에 수집하였음
- 그리고 10% 중성포르말린에 고정시키고 1% agarose로 처리하여 파라핀포매를 하고, Hematoxylin and Eosin(H&E)염색과 Masson's Trichrome(MT) 염색을 하여 세포구조와 콜라겐 침착

정도를 평가하였음

- H&E 염색결과, 자궁 횡문근종은 근육다발이 나선형으로 회전하면서 회전 타원체를 형성하며, 이런 패턴은 자궁 횡문근 세포에서 덜 관찰되었으며, MT염색에서도 자궁횡문근종의 회전타원체에서 보다 많은 콜라겐 침윤이 확인되었음
- 따라서, 자궁근종 섬유성 회전 타원체는 내분비 교란물질에 의해 유도되는 비유전성 신호 전달 및 섬유화 분자 기전을 연구하는데 모델로 적용할 수 있음

- Bisphenol A and Its Analogues Induce Fibrosis in a 3D Human Uterine Fibroid Model

- 발표자 : Jingli Liu 등(NIEHS)
- Bisphenol A (BPA)와 그 유사체(BPS, BPAF)는 에스트로겐과 유사 성질을 가진 환경 내분비교란물질로, BPA는 간, 폐, 심장 등에서 섬유화를 유발하고, 특히, BPA 및 BPAF는 마우스 자궁에서 섬유화를 유발하는 것으로 보고되어 있음
- 여성에서 자궁 횡문근종(또는 자궁근섬유종)은 흔히 발생하는 에스트로겐 반응성 종양으로 세포외 기질(Extracellular matrix, ECM)의 과도한 축적이 특징으로, 자궁근섬유종의 섬유성 변화에서 환경 에스트로겐의 역할은 밝혀져 있지 않음
- 3차원 사람 횡문근종 배양(Ht-UtLM)을 이용해서 BPA, BPS 및 BPAF (10^{-6} -100 mM)의 세포 증식, 섬유화, 유전자 발현에 대한 연구를 실시하였으며, 세포배양은 Cell counting kit-8 assays 이용하여 감별하였으며, BAF에서 유전자 발현 감별은 Fibrosis pathway-focused RT² ProfilerTM PCR array, 섬유화는 파라핀 섹션에서 Masson's Trichrome (MT)염색, 세포외 기질 구성 물질은 Western blotting을 이용하여 확인하였음
- 실험결과, BPA, BPS 및 BPAF는 3차원 배양모델에서 세포 증식 및 섬유화를 모두 증가시켰으며, 세포외 기질 구성물질인

Fibronectin 발현도 모든 실험군에서 증가하였고, BPAF는 세포 외 기질 구성 물질과 전섬유화 유전자 발현을 증가 시켰으며, 항섬유화 유전자 발현을 억제시켰음

- 삼차원 자궁 횡문근종 배양모델에서 BPA, BPS 및 BPAF는 세포 증식 및 섬유화를 자극하며, 특히 BPAF는 전섬유화 유전자 발현을 증가시키므로, 삼차원 자궁 횡문근종배양은 섬유화 기전을 연구하는 하는데 좋은 모델로 사료됨

- AI-Based Method for Quantification of Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Mouse Model

- 발표자: Uttara Joshi 등(Aria matrix)
- 폐섬유화는 예후가 나쁜 만성 진행성 질병으로 치료 효과가 없는 것으로 알려져 있으며, 따라서 섬유화 동물모델을 이용한 새로운 치료제의 전임상 평가는 신약개발에서 중요함
- 지금까지 사람이 수행하는 폐섬유화 평가는 질적, 주관적, 시간 소모적이었음
- 본 연구에서는 AI 딥러닝(Deep learning)과 이미지 처리를 이용하여 폐섬유화 판독을 자동 정량화하는 기술을 확립하고 그 결과를 병리학자가 수행한 결과와 비교하였음
- 이미지 훈련은 10개체 40배율로 1000장의 이미지에서 수행하였으며(훈련 정확도 98.95%), 그 후 60개의 케이스 연구에서 검증이 이루어졌음
- Bleomycin을 투여한 마우스의 폐 두 세트에서, Picro-Sirius Red-Hematoxylin (PSR), Hematoxylin and Eosin (H&E) 염색을 한 다음 슬라이드 스캐너로 슬라이드를 이미지화 하였으며, 이미지는 512 x 512 픽셀화하여 다음 4가지 파라미터로 분할하고 정량화 하였음
- 1) Color deconvolution으로 콜라겐 침착을, 심층 신경망인 Resnet을 이용하여 주요 세기관지, 혈관, 주위 콜라겐을 제외

하고 2) 내강, 3) 중격, 4) 염증세포를 평가하였으며, 위 결과는 병리학자가 판독한 결과와 비교하였음

- AI 프로그램이 수행한 결과는 병리학자가 수행한 결과와 대비, 97.31% 일치율을 보였음
- AI를 이용한 이미지 판독은 폐섬유화 정량화 결과에서 정확성이나 재현성에서 병리학자가 수행결과와 거의 유사한 결과를 보였으므로, AI를 이용한 판독 정량화는 폐섬유화 정량을 대량 신속하게 처리할 수 있는 방법이 될 수 있음

○ 포스터 발표(1)

- Immunohistochemical Characterization of Oxidative Stress in Lung of Rats Exposed to Humidifier Disinfectant, PHMG • HCl
- 발표자 : 이용훈 연구위원, 차효근 대리
- PHMG는 샴푸, 물티슈, 및 특히 가습기 살균제에서 널리 사용된 항균제로, 역학연구는 2011년 임신부와 어린이들이 사망한 원인 불명의 폐질환 발병이 가습기 주성분인 PHMG • P와 연관이 있다고 밝혔으나, PHMG의 다른 파생물질인 PHMG • HCl에 대한 독성에 관한 정보는 부족하기 때문에 본 연구에서는 13주 반복시험의 랫드의 폐에서 산화적 스트레스의 특성을 밝히고자 하였음
- 수컷 F344 랫드는 PHMG • HCl을 0, 0.13, 0.40 및 1.20 mg/m³ 농도로 나누어 전신노출로 13 주간 노출하였고, 랫드의 폐에서 조직병리검사와 산화스트레스 마커인 4-HNE를 이용한 면역조직화학법을 실시하였으며, 양성세포 수는 Image J를 이용하여 분석하였음
- 조직병리검사 결과, 중농도 및 고농군의 폐에서 섬유화, 염증 세포침윤, 기관지 및 세기관지 상피의 탈락, 세기관지 폐포 증식 및 편평상피 화생, 기관지 및 세기관지 삼출물, 그리고 폐포 삼출물 등이 관찰되었으며, 면역조직화학법 결과에서는

4-HNE가 세기관지 상피, 특히 클라라 세포와 섬유화에 존재하는 대식세포에서 관찰되었고, 또한 4-HNE 양성세포수는 용량의존적으로 증가하였음

- 따라서 PHMG • HCl은 폐에서 산화스트레스를 유도하여 조직 손상 및 섬유화로 이어지는 염증을 유발하였음
- 본 실험은 PHMG의 산화스트레스를 면역조직화학법으로 증명한 첫 시험으로 가슴기 살균제로 피해를 입은 환자에서 PHMG에 의한 손상 기전을 밝히는데 도움을 줄 것으로 사료됨
- 영문초록 : Polyhexamethylene guandine (PHMG) was widely used as an antimicrobial additive in humidifier disinfectants as well as shampoos and wet wipes in Korea. Epidemiological studies reported that an outbreak of pulmonary disease with unknown cause, which pregnant women and children died from, was involved in PHMG • P, the main ingredient of humidifier disinfectants. Because there is still a lack of information on the mechanism of toxicity of PHMG • HCl, another derivate of PHMG, this study aimed to characterize the oxidative stress of PHMG • HCl in the lung of rats in 13-week repeated inhalation toxicity study. Male F344 rats were exposed to 0, 0.13, 0.40, or 1.20 mg/m³ of PHMG • HCl for 13 weeks via whole-body inhalation. Histopathological examination and immunohistochemistry for 4-HNE, oxidative stress marker, were conducted in the lung of rats. The number of 4-HNE positive cells was analyzed by Image J. In histopathological examination, lung lesions including alveolar/interstitial fibrosis with inflammatory cell infiltration, detachment of bronchial/bronchiolar epithelium, bronchiolar-alveolar hyperplasia, bronchiolar/alveolar

squamous metaplasia, bronchial/bronchiolar/alveolar exudate, and alveolar hemorrhage were observed in 0.40 and 1.20 mg/m³ groups. In immunohistochemistry, 4-HNE was expressed in the epithelium of bronchiole, mainly Clara cells and macrophages in the fibrosis. The number of 4-HNE positive cells significantly increased in dose-dependent manner. PHMG • HCl induces oxidative stress, which could cause tissue injury and inflammation that proceed to fibrosis in the lung of rats. Based on our results, this experiment is the first study that oxidative stress of PHMG is immunohistochemically proved. Therefore, our study could help elucidate the mechanism of PHMG-induced damages in the lung of patients that were injured by humidifier disinfectants.

○ 포스터 발표(2)

- Two-week Toxicity study of Humidifier disinfectant, PHMG • HCl by Whole Body Inhalation Exposure in Rats
 - 발표자 : 이용훈 연구위원, 차효근 대리
 - PHMG는 한국에서 가습기 살균제로 널리 사용된 살생제로서, 역학조사 결과 임신한 여성과 어린이에서 PHMG • P가 폐섬유화를 유발하여 사망을 한 것으로 밝혀졌으나 PHMG의 다른 파생물질인 PHMG • HCl에 대한 독성에 관한 정보는 부족하기 때문에 본 연구에서는 2주 반복시험에서 PHMG • HCl 독성을 밝히고자 하였음
 - 암수 F344 랫드를 PHMG • HCl 0, 1, 5 및 25 mg/m³ 를 2주 동안 전신노출로 노출하였으며, 임상증상, 체중, 혈액학, 혈청화학, 장기 중량, 육안 및 조직병리 검사를 실시하였음
 - 암수 25 mg/m³ PHMG • HCl 노출군에서 쇠약 및 수포음이

관찰되었으며, 모든 PHMG • HCl 노출군에서 혈액학, 혈청 화학 및 장기 중량에서 유의한 변화가 관찰되었고, 육안관찰 결과, 모든 PHMG • HCl 노출군의 폐에서 풍선화가 관찰됨

- 조직병리검사 결과, PHMG • HCl 노출군의 비강에서 호흡 및 이행상피의 위축 및 재생부터 편평상피 화생 및 후각 상피의 위축, 기관에서 상피의 위축 및 재생부터 편평상피 화생, 후두에서 염증 및 편평상피 화생, 폐에서 섬유화, 염증을 동반한 괴사, 염증세포 침윤, 기관지 및 세기관지 상피 탈락, 세기관지폐포 증식, 편평상피 화생, 폐포의 기종 및 출혈이 관찰되었음
- 따라서, PHMG • HCl은 랫드에서 임상증상, 혈액학, 혈액화학 및 장기중량의 유의한 변화를 동반하면서 비강, 후두, 기관 또는 폐에서 다양한 염증성 병변과 비증식성 병변을 유발하였으며, 본 시험은 PHMG • HCl의 조직병리학적 특징과 장기시험의 용량 설정에 대한 정보를 제시하였음
- 영문초록 : Polyhexamethylene guandine (PHMG) was widely used as a biocide in humidifier disinfectants in Korea. Epidemiological studies reported that PHMG • P provokes pulmonary fibrosis in pregnant women and children, which causes their death. Because there is still a lack of information on the toxicity of PHMG • HCl, another derivate of PHMG, this study aimed to characterize the toxicity of PHMG • HCl in rats in 2-week repeated inhalation toxicity study. Male and female F344 rats were exposed to 0, 1, 5, or 25 mg/m³ of PHMG • HCl for 2 weeks via whole-body inhalation. Clinical signs, body weights, hematology, serum chemistry, organ weights, and gross and histopathological examination were conducted. Emaciation and rale were observed in male and female 25

mg/m³ PHMG • HCl-exposed group. Significant changes in hematology, serum chemistry and organ weight were observed in PHMG • HCl-exposed groups. Gross observation showed ballooning in the lungs of rats in PHMG • HCl-exposed groups. In histopathological examination, atrophy/regeneration to squamous metaplasia of respiratory/transitional epithelium and atrophy of olfactory epithelium in nasal cavity, atrophy/regeneration to squamous metaplasia of epithelium in trachea, inflammation and squamous metaplasia in larynx, fibrosis, necrosis with inflammation, inflammatory cell infiltration, detachment of bronchial/bronchiolar epithelium, bronchiolar-alveolar hyperplasia, squamous metaplasia, alveolar emphysema, and hemorrhage in lung were observed in PHMG • HCl-exposed groups. PHMG • HCl causes a variety of inflammations and nonneoplastic proliferative lesions in the nasal cavity, larynx, trachea, or lung of rats in PHMG • HCl-exposed groups accompanied by significant changes of clinical signs, hematology, serum chemistry and organ weights. Based on our results, this experiment will provide information on histopathologic characteristics and dose selection for long term toxicity study

V. 시사점 및 특이사항

- 본 심포지엄은 NIEHS(National Institute of Environmental Health Sciences)/NTP(National Toxicological program), US EPA(Environmental Protection Agency), US FDA(Food and Drug Administration) 및 NIOSH(National Institute of Occupational Safety & Health) 등 미국 독성관련 주요기관과

대학 및 회사의 전문가들이 환경, 생태 및 직업 독성 등에 대한 최신 연구 결과와 그 의미에 대하여 발표하였음

- 최신 독성병리학 경향은 전통적인 관독과 실험방식에서 벗어나, Microarray 등 분자기법, MRI 등 영상기법, 바이오마커, 대체 실험법 및 생물정보학(bioinformatics) 등 다양한 첨단 실험기법과 결합을 통해서 발전하고 있어, 산업 화학물질 독성병리학 연구에서도 이를 응용한 연구가 필요하다고 사료됨
- 특히, 병리관독분야에서는 딥러닝(Deep learning)을 활용한 인공지능 스스로 독성 병변을 학습하고 분석하는 프로그램이 인도 Aria matrix 및 미국 Visiopharm사에서 개발되었으며, 현재로서는 적용범위가 제한적이고, 기술적 보완사항이 적지 않지만, 빠른 IT기술발달 속도를 볼 때 근미래에 GLP 독성병리관독에서도 도입이 될 수 있을 것으로 사료됨
- 또한, 포스터 섹션에서는 사람 3차원 자궁근종 배양 모델을 이용하여 화학물질의 영향 및 분자적 변화에 대한 연구 등이 소개가 되어 산업화학연구실에서 앞으로 수행할 여성 생식기계 독성연구에서 대체시험법과 독성발현경로(AOP) 연구에 활용할 수 있을 것으로 사료됨
- 그 외, 미국 NTP에서는 막대한 비용 소요, 현재까지 발암성 시험자료 축적 및 대체시험법 발달을 이유로 발암성 동물시험을 대체 시험법으로 전환하려는 움직임이 있음

VI. 수집자료

- STP 연자 및 포스터 초록집 각 1부

Immunohistochemical Characterization of Oxidative Stress in the Lung of Rats Exposed to Humidifier Disinfectant, PHMG+HCl

Yong-Hoon Lee, Hyogeun Cha

Pathology Department, Inhalation Toxicity Research Center, Occupational Safety & Health Research Institute, 339-30 Expore, Yuseong-gu, Daejeon, Korea, 34122



Introduction and objective

Polyhexamethylene guanidine (PHMG) was widely used as an antimicrobial additive in humidifier disinfectants as well as shampoos and wet wipes in Korea. Epidemiological studies reported that an outbreak of pulmonary disease with unknown cause, which pregnant women and children died from, was involved in PHMG+P, the major ingredient of humidifier disinfectants. Because there is still a lack of information on the mechanism of toxicity of PHMG+HCl, another derivate of PHMG, this study aimed to characterize the oxidative stress of PHMG+HCl in the lungs of rats in 13-week repeated inhalation toxicity study.

Methods

1. Experiment design

Group	Concentration (mg/m ³)	Number of animal
Control	0	5
Low	0.13	5
Mid	0.40	5
High	1.20	5

- 1) Animal: Male Fischer 344 rat
- 2) Test substance: PHMG+HCl
- 3) Route: Whole-body inhalation
- 4) Inhalation time: 6 h/day, 5 days/week, for 13 weeks
- 5) Histopathological examination and Immunohistochemistry
 - Positive cells of oxidative stress marker 4-HNE in the lung of rats was analyzed and counted with the Image J Program per unit area (0.25 mm²).

Results

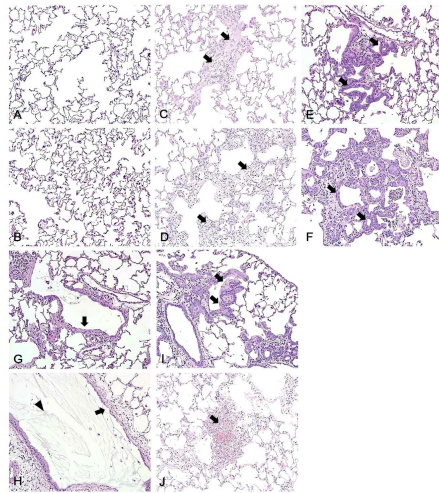


Figure 1. Histopathology of the lungs of rats exposed to PHMG+HCl. A), B) No abnormal lesion was observed in control and low dose group, respectively. C), D) Fibrosis with inflammatory cell infiltration (arrow) was observed in alveoli of mid and high dose groups, respectively. E), F) Hyperplasia of Type II pneumocyte was observed in alveoli of mid and high dose groups, respectively. G), H) Epithelial detachment (arrow) and exudate (arrow head) was observed in bronchi or bronchiole of mid and high dose group, respectively. I) Squamous metaplasia (arrow) were observed in alveoli and bronchioles of high dose groups. J) Hemorrhage (arrow) were observed in alveoli of high dose groups, respectively. Magnification: ×200, HE.

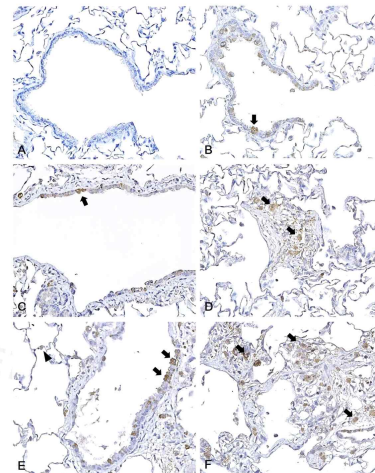


Figure 2. Immunohistochemical findings of the lungs of rats exposed to PHMG+HCl. A) No positive cells were observed in the lungs of control group. B) 4-HNE positive reaction was detected in the cytoplasm of Clara cells of bronchiolar epithelium (arrow) in low dose groups. C) 4-HNE positive reaction was observed in the cytoplasm of the Clara cells of bronchiolar epithelium (arrow) in mid dose group. D) 4-HNE positive reaction was found in the cytoplasm of macrophages (arrow) of fibrosis in mid dose group. E) 4-HNE positive reaction was observed in the cytoplasm of Clara cells of bronchiolar epithelium (arrow) and type II pneumocyte (arrowhead) of alveolus of high dose group. F) 4-HNE positive reaction was found in the cytoplasm of macrophages (arrow) of fibrosis in high dose group. Magnification: × 400, IHC.

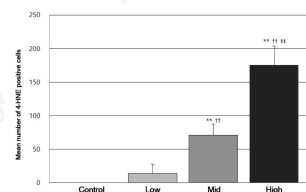


Figure 3. Comparison of the mean number of 4-HNE positive cells per unit area among groups. Significant differences; *P<0.01 compared with control group; †P<0.01 compared with low dose group; **P<0.01 compared with mid dose group.

Conclusion

PHMG+HCl induces oxidative stress, which could cause tissue injury and inflammation leading to fibrosis in the lungs of rats. This is the first study that oxidative stress of PHMG is immunohistochemically proved. Therefore, our study could help elucidate the mechanism of PHMG-induced damage in the lungs of patients injured by humidifier disinfectants.

References

1. Lee SJ, Park JH, Lee JY et al. Establishment of a mouse model for pulmonary inflammation and fibrosis by intratracheal instillation of polyhexamethyleneguanidine phosphate. J Toxicol Pathol. 9: 95-102. 2016.
2. Rahman I, van Schadewijk AA, Crowther AJ et al. 4-Hydroxy-2-nonenal, a specific lipid peroxidation product, is elevated in lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med. 166: 490-495.2002.

Two-week Toxicity study of Humidifier disinfectant, PHMG•HCl by Whole Body Inhalation Exposure in Rats

Yong-Hoon Lee, Hyogeun Cha



Pathology Department, Inhalation Toxicity Research Center, Occupational Safety & Health Research Institute, 339-30 Expo-ro, Yuseong-gu, Daejeon, Korea, 34122

Introduction and objective

Polyhexamethylene guanidine (PHMG) was widely used as a biocide in humidifier disinfectants in Korea. Epidemiological studies reported that PHMG•P provokes pulmonary fibrosis in pregnant women and children, which causes their death. Because there is still a lack of information on the toxicity of PHMG•HCl, another derivative of PHMG, this study aimed to characterize the toxicity of PHMG•HCl in rats in two-week repeated inhalation toxicity study.

Methods

1. Experiment design

Group	Concentration (mg/m ³)	Sex	
		Male	Female
Control	0	5	5
Low	1	5	5
Mid	5	5	5
High	25	5	5

- 1) Animal: Fischer 344 rat
- 2) Test substance: PHMG•HCl
- 3) Route: Whole-body inhalation
- 4) Inhalation time: 6 h/day, 5 days/week, for 2 weeks
- 5) Analyzed parameters: Clinical signs, body weights, hematology, serum chemistry, organ weights, and gross and histopathological examination

Results

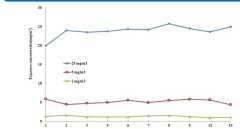


Figure 1. Exposure concentration of PHMG•HCl in chambers

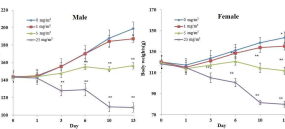


Figure 2. Change of body weight in rats exposed to PHMG•HCl
Significant differences as compared with control group: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Group (mg/m ³)	Clinical Signs	Male	Female
0	- No abnormality detected	- No abnormality detected	- No abnormality detected
1	- No abnormality detected	- No abnormality detected	- No abnormality detected
5	- No abnormality detected	- No abnormality detected	- No abnormality detected
25	- Most rats, after 8 day, 5/5 - Emaciation, after 13 day, 5/5	- Most rats, after 13 day, 2/5 - Emaciation, after 10 day, 5/5	- Most rats, after 13 day, 2/5 - Emaciation, after 10 day, 5/5

Table 1. Summary of Clinical signs in rats exposed to PHMG•HCl

Parameters	0	1	5	25
WBC(×10 ⁹ /L)	3.70±1.08	4.17±1.21	4.39±0.89	3.57±0.59
BA%(%)	0.22±0.11	0.18±0.08	0.28±0.13	0.14±0.09
EO%(%)	0.84±0.13	0.82±0.25	0.62±0.31	0.64±0.32
MCN(×10 ⁹ /L)	1.80±0.31	1.92±0.31	1.96±0.42	3.66±0.81**
LYM%(%)	67.82±5.85	64.84±5.37	60.40±4.09	45.96±5.98**
NEU%(%)	28.88±5.02	31.68±5.13	33.64±2.62**	49.32±8.67**
RBC(×10 ¹² /L)	8.42±0.32	9.18±0.33**	9.87±0.28**	10.34±0.24**
HCT(L)	46.42±1.98	50.64±1.72**	52.28±1.39**	53.30±0.69**
HGB(g/L)	15.44±0.58	16.56±0.68**	17.56±0.43**	18.46±0.33**
MCH(pg)	18.32±0.08	18.18±0.23	17.82±0.13**	17.84±0.05**
MCHC(g/dL)	33.28±0.35	32.94±0.52	33.62±0.29	34.64±0.32**
MCV(fL)	55.08±0.36	55.18±0.48	52.96±0.42**	51.54±0.67**
RET%(%)	3.94±0.42	3.92±0.55	1.75±0.39	4.49±0.26**
PLT(×10 ⁹ /L)	921.20±87.10	919.50±49.89	874.90±52.78*	921.00±123.33**

Table 2. Changes of Hematology in rats exposed to PHMG•HCl

Parameters	0	1	5	25
ALT(U/L)	57.90±6.28	53.18±1.67	57.47±8.81	72.78±15.22
AST(U/L)	76.84±4.39	75.50±5.76	92.20±16.29	106.80±19.88**
ALP(U/L)	1009.54±49.83	800.90±65.91**	778.63±58.64**	751.05±84.64**
GLU(mg/dL)	144.90±12.13	134.74±9.45	115.57±9.82	137.90±25.65
BUN(mg/dL)	18.20±1.82	17.22±0.75	14.97±0.51*	21.53±3.11
Cre(mg/dL)	0.37±0.03	0.36±0.02	0.37±0.02	0.37±0.02
T-CHO(mg/dL)	60.68±7.44	76.42±8.39*	89.67±9.92*	79.70±16.48
TG(mg/dL)	64.22±12.47	47.54±8.91*	26.77±1.32**	23.13±5.14**
TP(g/dL)	5.76±0.09	5.98±0.23	5.73±0.21	5.20±0.24*
ALB(g/dL)	4.20±0.07	4.34±0.11	4.13±0.12	3.78±0.13**

Table 3. Changes of Serum chemistry in rats exposed to PHMG•HCl

Absolute organ weight	0	1	5	25
Brain	1.687±0.035	1.692±0.065	1.636±0.027*	1.571±0.036**
Heart	0.606±0.049	0.600±0.023	0.484±0.052**	0.403±0.015**
Lung	0.861±0.050	1.387±0.137**	1.306±0.094**	1.407±0.119**
Liver	6.336±0.336	5.363±0.316**	3.867±0.203**	2.931±0.194**
Spleen	0.488±0.039	0.419±0.014**	0.318±0.013**	0.220±0.011**
Kidney	1.346±0.055	1.271±0.037**	1.015±0.035**	0.876±0.068**
Female				
Brain	1.658±0.029	1.600±0.063	1.590±0.096*	1.546±0.039**
Heart	0.508±0.02	0.488±0.036	0.410±0.015**	0.355±0.019**
Lung	0.748±0.088	1.040±0.068**	1.104±0.055**	1.328±0.171**
Liver	4.020±0.166	3.530±0.151**	2.887±0.178**	2.222±0.122**
Spleen	0.368±0.020	0.336±0.018**	0.285±0.015**	0.179±0.013**
Kidney	1.124±0.068	1.022±0.049**	0.878±0.033**	0.783±0.030**

Table 4. Changes of Organ weight in rats exposed to PHMG•HCl

Relative organ weight	0	1	5	25
Brain	0.857±0.044	0.947±0.054*	1.122±0.049*	1.557±0.055**
Heart	0.332±0.028	0.336±0.016	0.331±0.027	0.400±0.021**
Lung	0.438±0.014	0.775±0.070**	0.897±0.087**	1.388±0.163**
Liver	3.212±0.074	3.109±0.103	2.648±0.054**	2.902±0.131**
Spleen	0.248±0.024	0.234±0.003	0.218±0.006*	0.219±0.014
Kidney	0.683±0.024	0.711±0.009	0.696±0.007	0.807±0.051**
Female				
Brain	1.178±0.057	1.232±0.057	1.518±0.077**	2.066±0.071**
Heart	0.358±0.013	0.360±0.025	0.368±0.012**	0.435±0.037**
Lung	0.527±0.045	0.801±0.075**	1.051±0.044**	1.773±0.216**
Liver	2.837±0.017	2.715±0.056**	2.796±0.088	2.968±0.149
Spleen	0.260±0.009	0.251±0.007	0.272±0.010	0.239±0.015**
Kidney	0.729±0.020	0.786±0.018	0.836±0.024*	1.045±0.015**

Significant differences as compared with control group: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

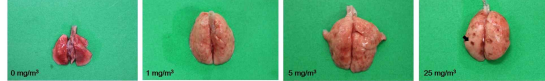


Figure 3. Gross findings of the lungs of rats exposed to PHMG•HCl
Gross observation showed ballooning of the lungs of all PHMG•HCl-exposed groups and red focus (arrow) in 25 mg/m³ PHMG•HCl group.

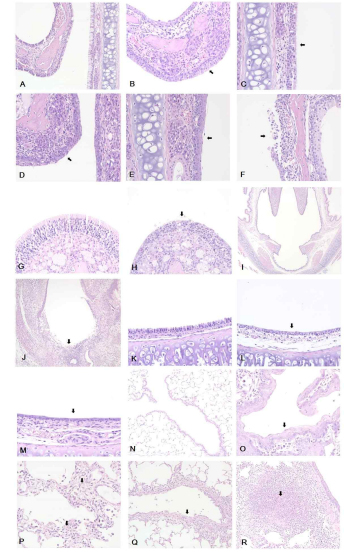


Figure 4. Histopathological features of rats exposed to PHMG•HCl
In nasal cavity, A) 0 mg/m³ group, x200. B) Degeneration of transitional epithelium (arrow) in 5 mg/m³ group, x400. C) Degeneration of respiratory epithelium (arrow) in 5 mg/m³ group, x400. D) Degeneration of transitional epithelium (arrow) in 25 mg/m³ group, x400. E) Degeneration of respiratory epithelium (arrow) in 25 mg/m³ group, x400. F) Ulceration of transitional epithelium (arrow) in 25 mg/m³ group, x400. G) Olfactory epithelium in 0 mg/m³ group, x400. H) Atrophy of olfactory epithelium (arrow) in 25 mg/m³ group, x400. I) Inflammation of lamina propria (arrow) in 25 mg/m³ group, x400. J) Degeneration of epithelium (arrow) in 5 mg/m³ group, x400. K) Atrophy/degeneration of epithelium (arrow) in 25 mg/m³ group, x400. L) Squamous metaplasia of bronchiole (arrow) in 25 mg/m³ group, x400. M) Fibrosis of alveoli (arrow) in 25 mg/m³ group, x400. N) Detachment of bronchiolar epithelium (arrow) in 25 mg/m³ group, x200. O) Alveolar necrosis with inflammation (arrow) in 25 mg/m³ group, x200. P) Alveolar necrosis with inflammation (arrow) in 25 mg/m³ group, x200.

Conclusion

PHMG•HCl causes a variety of tissue injury and inflammation in the nasal cavity, larynx, trachea, or lung of rats in all PHMG•HCl-exposed groups accompanied by significant changes of clinical signs, hematology, serum chemistry and organ weights. This study will provide information on PHMG•HCl-induced histopathologic characteristics and dose selection for long term toxicity study.