

보건분야-연구자료
연구원 2001-23-63
H-RD-I-2001-23-63

스테인레스 스틸 용접 흠 폭로에 의한 폐 섬유화 연구

한국산업안전공단
산업안전보건연구원

제 출 문

한국산업안전공단 이사장 귀하

본 연구결과를 2000년도 산업안전보건연구원의 연구사업
중 “스테인레스 스틸 용접흡 폭로에 의한 폐섬유화 연구”
에 대한 최종결과보고서로 제출합니다.

2000년 12월 31일

제 출 자 :	산업안전보건연구원장	정호근
연구책임자 :	수석연구원	유일재
공동연구원 :	기술직 3급	정용현
	기술직 5급	한정희

목 차

Abstract	1
I. 서론	1
II. 연구방법	2
III. 결과	5
IV. 고찰	14
V. 참고문헌	16

English Version

Abstract	19
I. Introduction	20
II. Materials and Methods	22
III. Results	25
IV. Discussion	27
V. References	29

Abstract

용접흡 폭로에 의한 진폐과정을 규명하기 위해 스테인레스 스틸 아크 용접흡 발생시스템을 만들어 실험동물을 90일 동안 폭로하여 진폐모델을 확립하였다. 랫트는 하루 2시간동안 $105-118\text{mg}/\text{m}^3$ TSP(total suspended particulates) 농도의 용접흡을 용접흡 폭로 챔버에서 폭로하여 90일 동안 폭로하였다. 철, 망간, 크롬, 니켈 등의 용접흡의 주요 금속들의 농도를 측정하였고 질소가스, 오존 등의 용접흡의 가스성 성분들을 모니터하였다. 실험동물들은 용접흡 폭로 후 2시간후, 15일, 30일 60일 후에 부검하여 상기도의 nasal pathway 와 conducting airway와 가스교환부위 즉 폐포관, 폐포낭, 폐포의 병리조직학적 검사를 행하였다. 대조군과 비교하여 폭로군에서는 폐의 무게가 15일부터 증가하기 시작하였고, 병리조직학적인 검사와 더불어 폐섬유화 특이염색인 Masson's trichrome 염색법으로 염색시 초기의 폐섬유화는 폭로후 15일부터 시작하여 폭로 후 30일 에는 perivascular와 peribrochiolar regions까지 진행하였고, 60일째에는 interstitial fibrosis가 나타났으며, 90일때에는 interstitial fibrosis가 뚜렷하게 나타났으며, plural fibrosis도 나타났다.

I. 서론

용접공들에게서 장기적으로 용접흡 폭로시 흉부 X-선 촬영시 방사선 투명한 부분(profusion of small opacities)이 발생한다고 한다. 특히 산화철에 폭로된 용접공에서는 산화철 진폐 (siderosis)가 발생하는데 이의 특성은 비정상적인 흉부 X-선 촬영이지만 폐기능에는 영향을 미치지 않는다고 한다 (Beckett, 1996). Siderosis를 가지고 있는 용접공들은 용접을 중단하면 점진적으로 흉부 X-선 촬영이 정상적으로 돌아간다고 한다. 1978년 영국에서 행한 전기아크용접공 역학조사에서 용접공의 7%가 어느 정도의 진폐를 가지고

있으나 진행적인 심한 폐섬유화는 전혀 발견되지 않았다고 한다 (Artfield & Ross, 1976). 이와 반대로 기능적인 폐섬유화는 유리규산과 이산화질소나 다른 용접흡의 성분들이 폭로된 근로자에게서 심한 정도의 폐섬유화가 발견되었다고 한다 (Guidotti et al., 1978). 폐에서 유리규산이 발견되지 않으면서도 interstitial fibrosis가 생긴 경우에는 유리규산의 폭로없이도 용접흡 폭로에 의해 장기적인 interstitial pulmonary fibrosis가 생긴다고 한다 (Funahashi et al., 1988). 시험관법연구에서 스테인레스 스틸 용접흡 성분인 6가크롬과 이산화질소가 섬유화의 의심물질로 제시되고 있다 (Stern et al., 1983). 가장 많이 사용되고 있는 용접형태인 스테인레스 스틸아크용접 (MMA-SS)이 가장 많이 독성물질을 방출한다고 하며 (Kalliomaki et al., 1986), 다른 형태의 용접보다 더 많이 유해산소를 방출하며 더 많은 종류의 세포독성물질을 거식세포 (macrophage) 에서 방출된다고 한다. (Antonini et al., 1997, 1999).

용접흡에 의한 폐섬유화를 유도하기 위해 실험동물을 이용하여 흡입이나 주입시험을 이용하여 반복적으로 용접흡 폭로시험이 시도되었지만 (Hicks et al., 1983; Uemitsu, 1984; Kalliomaki et al., 1986), 용접흡에 의한 폐섬유화 질환과정은 아직도 명확히 규명되지 않았다. 지난 연구에서 확립된 용접흡을 장기적으로 폭로시킬 수 있는 시스템을 이용하여 (Yu et al., 2000), 폐섬유화의 병리학적 과정의 규명을 이번 연구에서 시도하였다. 용접흡을 90일 동안 폭로하여 폐섬유화 모델을 개발하였다.

II. 연구방법

2.1. 스테인레스 스틸 용접흡 발생

용접흡은 유일재 등의 방법에 의해 발생하였다 (Yu et al., 2000). 용접흡은 회전하는 스테인레스 회전판 (SUS 304, 50 mm diameter, 1 cm thickness)을

모재로 하여 용접봉 홀더에 고정된 용접봉 (KST 308, 26 x 300 mm, Korea Welding Electrode Co. LTD, Seoul)을 접촉하여 아크 용접흡을 발생하였다. 용접봉이 풀리에 의해 회전판에 접근하면서 아크가 발생하고 용접봉이 소비되어 용접흡이 발생하여 흡입챔버로 유입되었다 (whole body type, 1.3 m³, Dusturbo, Seoul).

2.2. 용접흡 입자의 직경 측정

용접흡의 공기역학적 평균 직경 (mass median aerodynamic diameter)을 측정하기 위해 Anderson sampler (AN-200, Shibata, Tokyo)를 사용하였다. 유입량은 포집시간은 5분이었다.

2.3. 용접흡의 성분분석과 폭로 농도 분석

용접흡은 개인용 시료포집기로 2 liter/min로 포집하였다 (MSA 484107, Pittsburgh). 필터에 포집된 용접흡은 (pore size 0.8 μ m, 37 mm diameter, Millipore AAWP 03700, Bedford) Inductive Coupling Plasma analyzer (ThermoJeralash, IRIS, Houston)로 NIOSH 7300 방법 (NIOSH, 1999)을 이용하여 분석하였고, NIOSH method 7604 (1999)으로 Cr VI을 분석하였다. 총 크롬을 분석하기 위하여 시료는 2% NaOH, 2% Na₂CO₃의 용액에 보관하였다. 6가 크롬은 탈이온수에 보관하였다. 총크롬은 마이크로웨이브 오븐에서 Ashing 전처리한 후 atomic absorption spectrophotometer (SpectAA-800, Varian, Palo Alto)로 분석하였다. Cr VI은 base와 탈이온수로 추출한 후 ion chromatography (DX-500, Dionex, Sunnyvale)로 분석하였다.

가스상 오존, 이산화질소, 질소흡은 Dräger tubes (Cat No. 6733181, CH 31001, CH 30001, respectively)로 측정하였다. 용접흡의 가스성 물질은 용접흡 폭로가 시작된후 1시간 이후에 gas detector pump (6400000, Dräger, Lübeck)를 이용하여 측정하였다.

2.4. 흡입독성시험

5주령의 스킷 SPF (specific pathogen-free) Sprague Dawley 랫트를 Charles River Laboratory (Japan)에서 구입하여 12-h light, 12-h dark cycle (light from 08:00 to 20:00 h)로 순화하였다. 실험동물은 Purina Chow 5001 (Ralston Purina Co., St Louis, MO)와 음용수를 무제한 공급하여 사육하였다. 랫트가 $134 \pm 7\text{g}$ 정도되었을 때 무작위로 6실험군으로 나누어 용접흡에 2시간 폭로 후 또는 15일, 30일, 60일, 90일 폭로 후 동물을 부검하였다. 각 시험군은 4마리의 비폭로동물과 4마리의 폭로동물로 구성되어 있었다. 2시간 동안의 TWA 농도는 $105\text{--}118\text{ mg/m}^3$ 였다.

2.5. 조직병리

용접흡 폭로후 랫트는 diethyl ether로 마취하여 복대동맥에서 혈액을 채취하였다. 폐, 기관, 부신, 고환, 심장, 신장, 비장, 간, 뇌를 떼어내어 10% 중성인산완충 포르말린 용액에 고정하였다. 후두부 조직은 유일재 등의 방법에 의해 준비되었다 (Yu et al., 2000). 후두부는 nasopharyngeal duct를 10% 중성인산완충 포르말린 용액을 주입하여 고정하였다. 조직은 7일간 중성인산완충 포르말린용액에 7일간 고정후 70% methanol에 1시간 처리하여 탈지한 후 methanol-chloroform (1:1)에 1시간, 70% methanol에 한시간 처리하였다. 시료는 5% formic acid에 적어도 7 일간 처리하여 탈회하여 중성인산완충 포르말린 용액에 보관하였다. Proximal nasal pathway 에서 distal nasal pathway 까지 3 section (incisor teeth, incisive papilla, and molar teeth region)을 만들어 파라핀에 포매하여 hematoxylin & eosin (H&E)으로 염색하여 광학현미경으로 검경하였고 어떤 조직은 섬유화를 검색하기 위해 Masson's trichrome로 염색하였다 (Carson, 1990).

III. 결과

3.1. 스테인레스 스틸 용접흙의 특성화

용접흙 입자의 공기역학적 직경은 Table 1에 보이듯이 90% 이상의 입자의 직경이 $1\ \mu\text{m}$ 보다 작은 것을 알 수 있고 50%의 입자들은 0.65 와 $0.43\ \mu\text{m}$ 사이에 분포한 것을 알 수 있다. 스테인레스 스틸 용접흙의 성분은 주로 철, 망간, 크롬, 니켈로 구성되어 있으며 이들의 성분과 가스성 성분의 함량은 Table 2에 나타나 있다.

Table 1. Size distribution of stainless steel welding fume particles by Anderson sampler.

Size (μm)	% sampled	Cumulative (%)
11.0-7.00	0	100
7.00-4.70	0	100
4.70-3.30	0.61	
100		
3.30-2.10	1.64	99.39
2.10-1.10	7.18	97.75
1.10-0.65	28.12	90.57
0.65-0.43	35.67	62.45
> 0.43	26.78	26.78

Table 2. Concentrations of MMA-SS welding fume components.

	Concentrations
Fe	3.4 - 5.8 mg/m ³
Cr	2.4 - 2.9 mg/ m ³
CrVI	1.8 - 2.2 mg/ m ³
Mn	2.7 - 3.3 mg/ m ³
Ni	1.2 mg/ m ³
O ₃	0.1 - 0.15 ppm
NO ₂	0.5 ppm
Nitrous fumes	20 ppm

3.2. 체중 변화와 동물관찰 결과

용접흠에 폭로된 랫트는 90일 동안의 폭로기간 중 통계학적으로 유의한 체중변화를 보여주고 있다. 그러나 용접흠에 폭로된 동물들은 특별한 행동의 변화는 보여주지 않았다.

3.3 장기 무게 변화 결과

Figure 1에 보이듯이 90일 동안 용접흠에 폭로된 랫트의 전체 폐중량은

대조군과 비교하여 유의한 ($P<0.05$) 변화를 보여주었다. 폐중량은 폭로 15일째부터 뚜렷한 변화를 보이기 시작하여 폭로종료시 90일 까지 증가하였다. 대조군과 비교하여 폭로군의 폐 중량은 초기 30일 까지는 급속히 증가하였으나 폭로후 30일과 60일 사이에는 안정된 양상을 보여주었다. 그러나 60일과 90일 사이에 또 한번의 급속한 폐중량 증가를 보여주었다. 부신, 고환, 신장, 심장, 비장, 간, 뇌 등의 다른 장기에서는 유의한 장기무게의 변화를 보여주지 않았다.

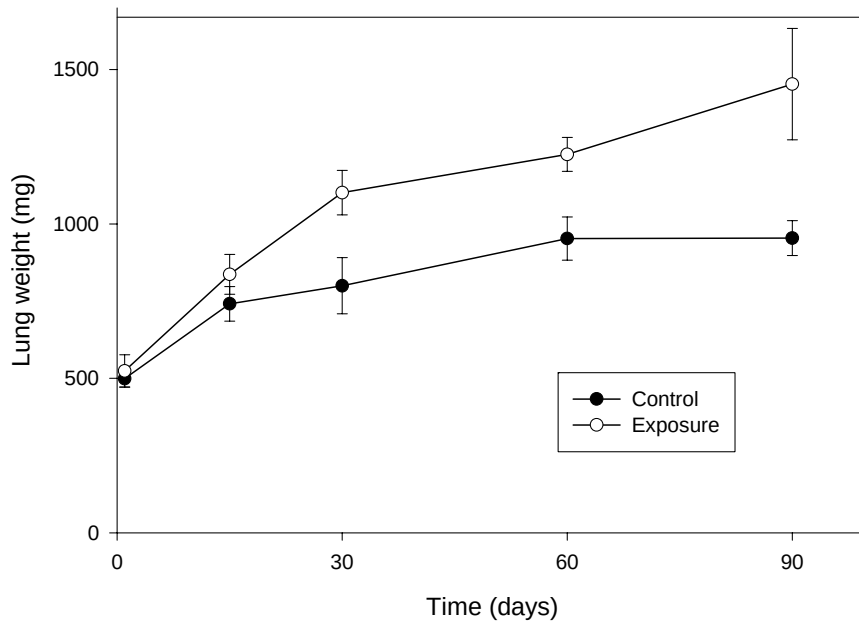


Figure 1. Lung weight changes of rats during 90 days of MMA-SS welding fume exposure. Male rats were exposed to 105–118 mg/m³ of MMA-SS welding fumes for 90 days. Four rats were assigned to each exposure group. Lung weight was measured at 2 hours and at 15, 30, 60, and 90 days after exposure.

3.4. 해부병리학적 조직병리학적인 검사 결과

용접흠에 폭로된 랫트의 폐 pleural surface는 회색을 띄며 동그랗고 부풀

러 오른 반점을 보여주며 폐는 줄어들어 있었다. 처음에는 이런 증상은 심하지 않았지만 점점 심해가는 경향을 보여주었다. 90일 동안 용접흡에 폭로된 랫트의 폐에서의 섬유화 형태는 Table 3에 요약하였다. 조직병리학적인 검사에서 2시간 용접흡에 폭로된 동물의 폐는 용접흡 입자를 탐식한 거식세포가 세기관지 (small bronchioles)에서 발견되었다 (Figure 2A, filled triangles). 세기관지나 폐의 parenchyma에서는 섬유화가 전혀 발견되지 않았다 (Figure 2C,). 용접흡 폭로 후 섬유화 특이 염색인 trichrome 염색을 하였을 때 15일 이후의 폐에서는 혈관주위의 염증 (perivascularitis)이 발견되었으며 (Figure 2B, filled square) 미세한 초기의 섬유화가 세기관지 주위와 혈관주위에서 발견되었다 (Figure 2D, arrows). 용접흡 폭로후 30일 이후의 폐에서는 입자를 탐식한 거식세포들이 폐포 (alveolar spaces)에서 발견되었으며 (Figure 3A, filled triangles) 초기의 섬유화가 혈관주위에서 발견되었다 (Figure 3C, arrows). 세기관지에서 입자를 탐식한 거식세포들은 alveolar lipoproteinosis 또는 multifocal histiocytosis와 같은 모양을 보여주었다 (see Weller, 1996). 용접흡에 60일 동안 폭로된 폐에서는 granulomatous regions을 보여주었고 뚜렷한 섬유화를 혈관주위나 세기관지 주위에서 보여주었고 (Figure 3B, stars) 어느 정도의 interstitial fibrosis (Figure 3D, arrows)도 나타내었다. 용접흡에 90일동안 폭로된 폐에서는 용접흡을 탐식한 거식세포가 폐포공간을 채우고 있었고 어떤 거식세포들은 입자를 축적하여 macule 형태를 보여주었다 (Figure 4A, triangles). 그리고 granulomatous 부위도 발견되었고 (Figure 4B, stars) interstitial fibrosis와 peri-pleural fibrosis도 발견되었다 (Figure 4C, arrows). 후두부 squamous, transitional, respiratory and olfactory epithelium도 관찰했지만 중요한 병리현상을 발견할 수 없었고 기관이나 기관지에도 중요한 병변이나 용접흡 입자의 흡착을 발견할 수 없었다

Table 3. Types of fibrosis observed after 90 day welding fume exposure

Exposure	Early & delicate	Perivascular & bronchiolar	Interstitial	
Pleural	fibrosis	fibrosis	fibrosis	
Group			fibrosis	
fibrosis	No. of case	No. of case	No of case	No
of case				
Control	0	0	0	0
2 hour	0	0	0	0
15 day	2	0	0	0
30 day	2	2	0	0
60 day	0	4	2	0
90 day	0	4	4	2

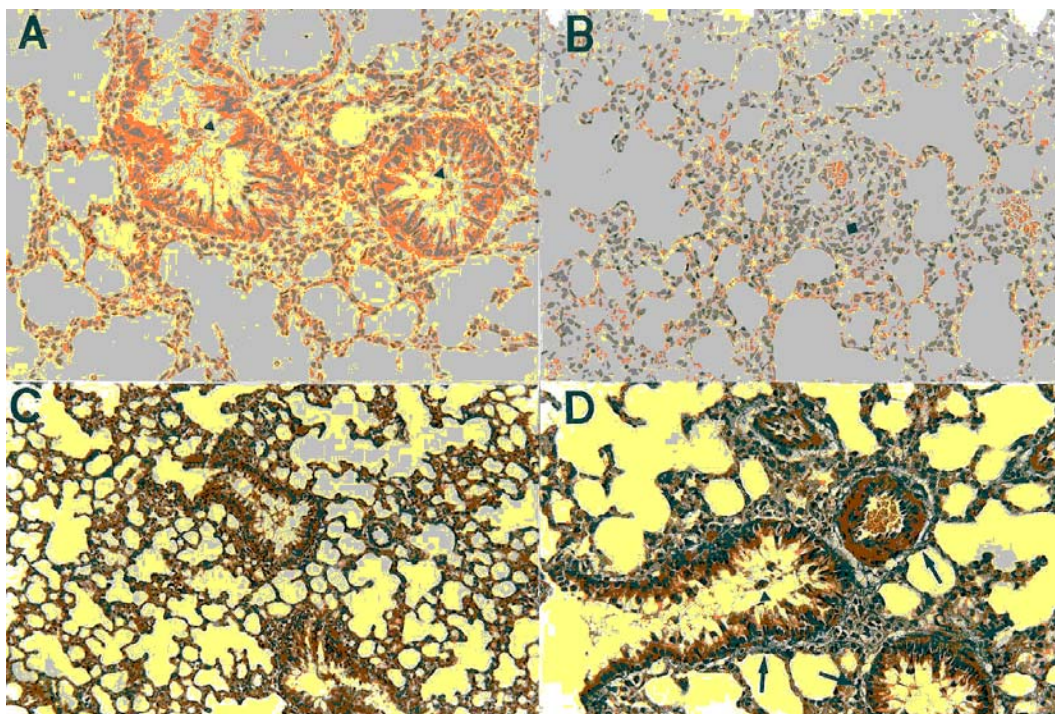


Figure 2. Histopathology of the lungs of the rats exposed to MMM-SS welding fumes for 2hrs and 15 days. (A & C), 2hrs after the initial exposure; (B & D) 15 days after exposure. (A & B), H&E staining; (C & D), trichrome staining. The filled triangles indicate welding fume-ingested alveolar macrophages. The filled square indicates perivascularitis. The arrows indicate fibrosis stained by the trichrome staining (bluish color, 200x objective).

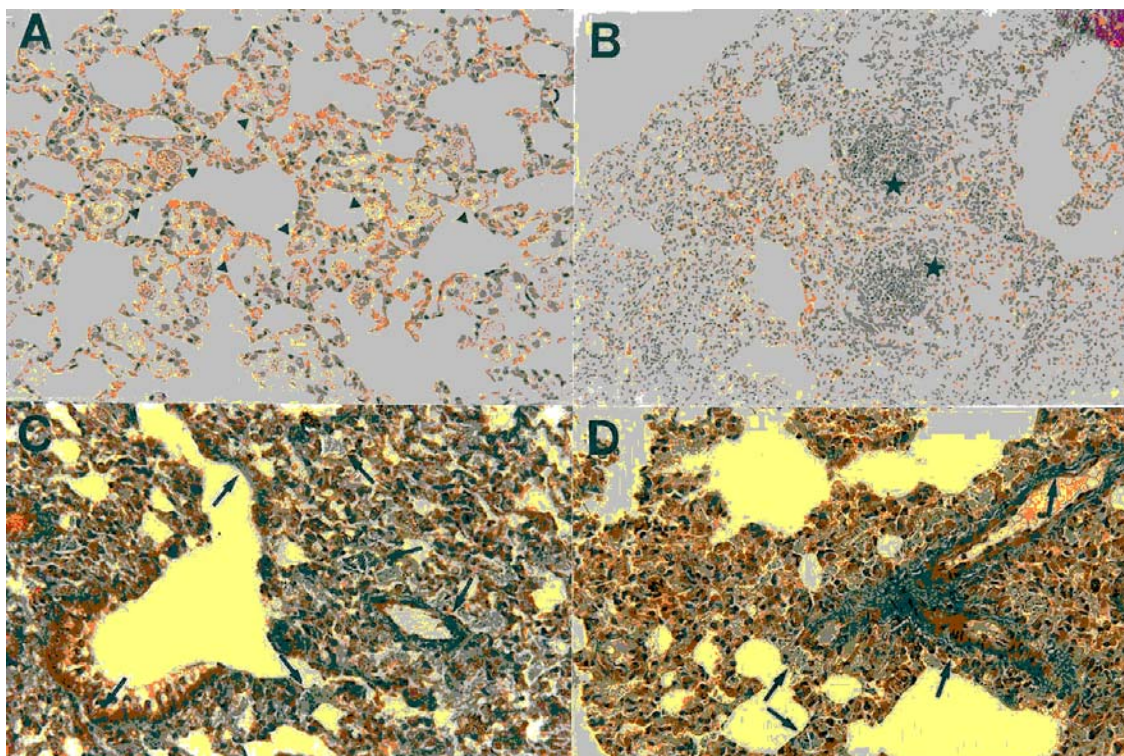


Figure 3. Histopathology of the lungs of the rats exposed to MMM-SS welding fumes for 30 and 60 days. (A & C) 30 days after exposure; (B & D) 60 days after exposure. (A & B), H&E staining; (C & D), trichrome staining. The filled triangles indicate welding fume-ingested alveolar macrophages. The arrows indicate fibrosis in interstitia and peribronchiolar and perivascular areas stained by the trichrome staining (bluish color). Stars indicate granulomatous regions (200x objective).

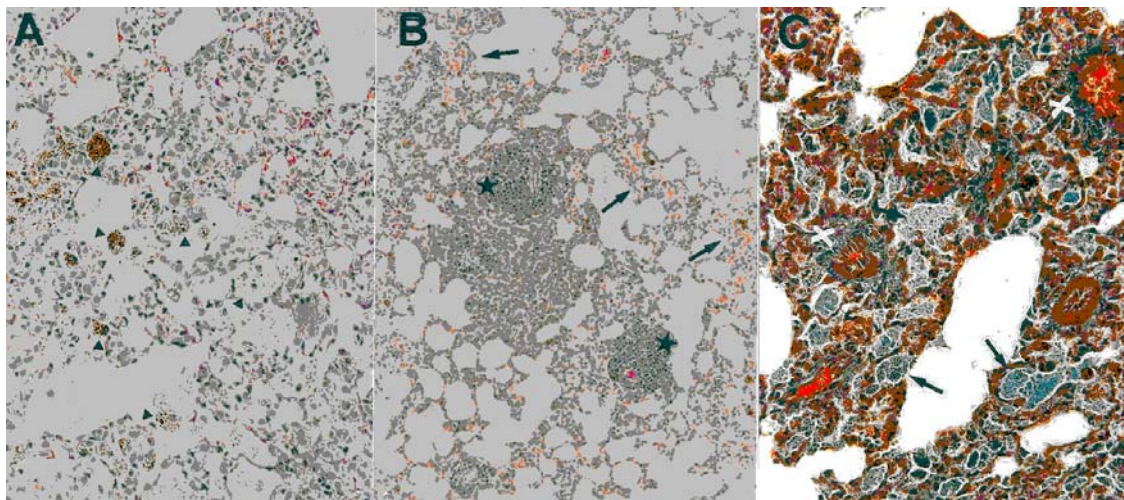


Figure 4. Histopathology of the lungs of the rats exposed to MMM-SS welding fumes for 90 days.. (A), particle laden macrophages and macules in the alveolar regions (filled triangles). (B), granulomatous regions and fibrotic regions. (C), interstitial fibrosis (arrows) and perivascular fibrosis (X). (A & B), H&E staining; (C), trichrome staining (200x objective).

IV. 고찰

용접흡 입자는 용접흡을 유일재 등이 개발한 용접흡 폭로시스템을 이용하여 실험동물에 단기간 폭로하였을 때 호흡기의 낮은 부위 즉 세기관지, 폐포관, 폐포낭, 폐포에 흡착하는 것을 알 수 있었다 (Yu et al., 2000). 유일재 등의 용접흡 폭로시스템의 장점인 장기간 용접흡 폭로가 가능한 점을 이용하여 이번 연구에서는 스테인레스 스틸 아크 용접흡을 지속적으로 폭로했을 때 폭로 개시후 60일 정도에서 interstitial fibrosis가 유도되는 것을 발견하였다. 정확한 폐 섬유화의 원인물질은 이번 연구에서 명백히 발견되지 않았지만, 용접흡의 입자성분과 가스성분 모두가 섬유화 유도에 기여했으리라고 생각된다. 이 연구에서 제안되는 용접흡 폭로에 의한 폐섬유화는 폭로된 동물의 폐 무게를 대조군과 비교했을 때 3가지 입자 축적단계로 특징지을 수 있다. 초기는 폭로개시후 30일까지로 초기의 입자 축적단계 (initial overloading phase)로 급속한 폐 무게의 증가로 특징지을 수 있다. 이 시기에는 혈관주위 염증 (perivascularitis)와 혈관주위 (perivascular)와 세기관지 주위 (peribronchiolar)의 섬유화가 나타나고 (recruitment of macrophage) 거식세포의 이동이 폐포공간에서 나타나는 것이 주요한 변화이나 거식세포의 입자제거능력은 최대화에 이르지 않아 축적된 입자들은 완전히 제거할 수는 없다고 생각된다. 제 2기는 폭로 개시후 30일부터 60일 사이로 폐중량의 증가가 완만하며 입자의 축적과 제거가 평형을 이루는 것을 볼 수 있다. 혈관과 세기관지 주위의 뚜렷한 granulomatous 부위들과 interstitial fibrosis가 뚜렷한 증상이었으며, 거식세포의 이동 (recruitment of macrophage)의 최대가 되어 거식세포에 의한 제거가 최대가 되는 시기이다. 어떤 거식세포는 용접흡 입자를 세포질에 축적한 후 터져나가는 듯한 모양을 보여주었다. 만약 이시기에 폭로를 멈추면 폐섬유화를 멈출수 있다고 생각된다. 제 3번째 시기는 60일부터 90일 사이로 2번째 입자축적기로 급속한 폐중량 증가와 interstitial fibrosis 와 pleural fibrosis로 특징지을 수 있다. 이 시기의 폐는 거식세포의 이동은 최대화되었지만 거식세포의 제거능력은 폐에 축적된 용접흡을 제거 할 능력은 없다고 생각된다. 이 시기에 폭로를 멈추어도 섬유

유화가 멈추지 않는다고 생각된다. 우리 연구결과의 용접흡 폭로에 의한 섬유화 모델은 3가지 단계를 보여주는 것으로 다른 시험관 연구나 (Antonini et al., 1997, 1999) 또는 용접흡 주입방법을 이용한 다른 동물실험 연구 (Antonini et al., 1997; Taya et al., 1999)나 또는 동물을 이용한 용접흡 흡입시험 (Hicks et al., 1983; Uemitsu et al., 1984)에서도 나타나지 않은 것이다. 우리연구는 지속적인 용접흡 농도를 유지하여 실제 작업환경과 비슷한 조건을 갖추고 있었다.

전자현미경을 이용하여 용접흡 입자 직경을 측정하였을 때 용접흡 입자는 기하분포를 하고 있었으며 입자의 직경은 0.023 에서 0.81 μm 까지 분포하였으며 기하평균 입자직경은 0.1 μm 이었다 (Yu et al., 2000). Anderson sampler를 이용한 측정치와 5-6배의 차이는 입자의 밀도 때문이라고 생각된다. 용접흡 단기폭로 시험결과 (Yu et al., 2000)에서 나타나듯이 90일 폭로시험에서도 용접흡 입자 직경은 너무 작아 nasal pathway나 conducting airway에 흡착하지 않았다. 입자나 가스폭로가 nasal pathway나 conducting airway에 미치는 영향은 연구 중에 있다.

용접흡의 가스성 물질 6가크롬 (Cr VI), 오존 (ozone), 이산화 질소 (nitrogen dioxide)와 질소 흡(nitrous fumes)들의 독성학적인 역할은 추가적이거나 또는 상승적으로 폐섬유화에 작용하리라고 생각된다. 0.4 ppm의 ozone과 7 ppm의 nitrogen dioxide의 60-90일 폭로로 폐섬유화가 유도될 수 있다고 하는데 (Ishii et al., 2000), 우리 연구에서의 ozone 과 nitrogen dioxide 농도는 낮았지만 (0.1 and 0.5 ppm, respectively), 이런 가스의 폭로는 입자폭로에 의한 폐섬유화를 촉진할 수 있으리라고 생각된다.

용접흡 입자의 탐식이나 용접흡 성분의 가스성 성분의 폭로는 neutrophil을 동반하는 지속적인 염증반응이 없이 거식세포에서의 섬유화촉진 cytokine을 분비할 수 있다고 생각된다 (Ishii et al., 2000). 이번 연구에서의 용접흡에 폭로된 랫트의 폐조직에서는 전혀 neutrophil 반응을 보여주지 않았고 용접흡의 폭로 개시부터 용접흡 폭로 종료일 (90일)까지 거식세포의 이동을 보여주었다. 따라서 스테인레스 스틸 아크 용접흡 폭로에 의한 폐섬유화는 용접흡을 탐식한 거식세포에서 유래한 것이라고 생각된다.

V. 참고문헌

Antonini, J. M., Krishna-Murthy, G. G., and Brain, J. D. (1997). Responses to welding fume: lung injury inflammation and release of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β . *Exp. Lung Res.* **23**(3), 205-227.

Antonini, J. M., Lawryk, N. J., Murthy, G. G., and Brain, J. D. (1999). Effect of welding fume solubility on lung macrophage viability and function in vitro. *J. Toxicol. Environ. Health*, **58**(6), 343-363

Artfield, M. D. and Ross, D.S. (1978). Radiologic abnormalities in electric-arc welders, *Br. J. Ind. Med.* **35**, 117-122.

Beckett, W. S. (1996). Industries associated with respiratory diseases: Welding, Occupational and environmental respiratory diseases, pp 704-717. Harber P., Schenker M. B., Balmes, J. R. editors, Mosby, St. Louis, Missouri.

Carson, F. (1990). Histotechnology a self-instruction text, 1st Ed., 142-143, ASCP III. Funahashi, A., Schleuter, D, Pintar, K, Bemis, E. L., and Siegesmund,

K.A. (1988). Welders pneumoconiosis: tissue elemental microanalysis by energy dispersive X-ray analysis, *Br. J. Ind. Med.* **45**, 14-18.

Guidotti, T. L., Abraham, J. L., DeNes, P. B., and Smith, J. B. (1978). Arc welders pneumoconiosis: application of advanced scanning electron microscopy, *Arch. Environ. Health* **33**, 117-124,

Hicks, R., Al-Shamma, K. J., Lam, H. F., and Hewitt, P.J. (1983). An investigation of fibrogenic and other effects of arc-welding fume particle deposited in the rat lung. *J. Appl. Tox.* **3**, 297-306.

Ishii, Y., Hirano, K., Morishima, Y., Masuyama, K., Goto, Y., Nomura, A., Sakamoto, T., Uchida, Y., Sagai, M., Sekizawa, K. (2000). Early molecular and cellular events of oxidant induced pulmonary fibrosis in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **167**(3), 173- 81.

Kalliomaki, P.C., Hyvarinen, H. K., and Aitio, A., (1986). Kinetics of the metal components of intratracheally instilled stainless steel welding fume suspensions in rats. *Br. J. Ind. Med.* **43**(2), 112-119.

NIOSH, (1999). NIOSH manual of analytical methods, method No. 7300, 7604. Cincinnati

Stern, R. M., Pigott, G. H., and Abraham, J. L. (1983). Fibrogenic potential of welding fumes, *J. Appl. Toxicol.* **3**, 18-30.

Uemitsu, N., Shimizu, Y., Hosokawa, T., Nakayoshi, H., Kobayashi, M., Minato, S., Ogawa, T., and Tsutsumi, S. (1984). Inhalation toxicity study of welding fumes: effect of single or repeated exposure on the lungs of rats. *Toxicology* **30**, 75-92.

Weller, W., (1996). Alveolar lipoproteinosis, rat. Monographs on pathology of laboratory animals: Respiratory system. Jones, R.C., Dungworth, D.L., Mohr, U. editors. Springer, NY.

Yu I. J., Kim, K. J., Chang, H.K., Song, K. S., Han, K. T., Han, J. H., Maeng, S.H., Chung, Y. H., Park, S.H., Chung, K. H., Han, J.S., and Chung

H. K. (2000), Pattern of deposition of stainless welding fume particle inhaled into the respiratory systems of Sprague-Dawley rats exposed to a novel welding fume generating system, *Toxicology Letters* **116**, 103-111.

Lung Fibrosis in Sprague Dawley rats, Induced by Welding Fume Exposure to Manual Metal Arc-Stainless Steel

Il Je Yu, Kyung Seuk Song, Hee Kyung Chang, Jeong Hee Han, Kwang Jin Kim, Yong Hyun Chung, Seung Hee Maeng, Seung Hyun Park, Kyu Hyuk Chung, Kuy Tae Han, and Ho Keun Chung

Center for Occupational Toxicology, Occupational Safety & Health Research Institute, Korea Occupational Safety & Health Agency

Lung Fibrosis in Sprague Dawley rats, Induced by Welding Fume Exposure to Manual Metal Arc-Stainless Steel

Il J Yu, Kyung Seuk Song, Hee Kyung Chang, Jeong Hee Han, Kwang Jin Kim, Yong Hyun Chung, Seung Hee Maeng, Seung Hyun Park, Kyu Hyuk Chung, Kuy Tae Han, and Ho Keun Chung

Abstract

In order to investigate the disease process pneumoconiosis induced by welding fume exposure, a lung fibrosis model was established by building a stainless steel arc welding fume generation system and exposing male Sprague Dawley rats for 90 days. The rats were exposed to welding fumes with concentrations of 105–118mg/m³ total suspended particulates for 2 hrs, in an inhalation chamber for 90 days. Concentrations of main metals, Fe, Mn, Cr, and Ni, were measured in the welding fumes, and gaseous compounds, including nitrous gases and ozone, were monitored. Animals were sacrificed at 2 hours, and at 15, 30, 60 and 90 days during the exposure period. Histopathological examinations were conducted on the animals upper respiratory tract, including the nasal pathway and the conducting airway, and on the gas exchange region, including, alveolar ducts, alveolar sacs and alveoli. Compared to the control group, the lung weight increased significantly from day 15 to day 90. Histopathological examination, combined with the fibrosis-specific staining (Masson's trichrome), indicated that early delicate fibrosis could start from day 15 and progress into the perivascular and peribrochiolar regions at day 30. Interstitial fibrosis appeared at day 60 and became prominent at day 90, when plural fibrosis also appeared.

I. Introduction

Welders developed an increased profusion of small opacities on chest X-ray from chronic inhalation of welding fumes. Exposures to iron oxide fumes cause iron oxide pneumoconiosis (called siderosis), a prominently abnormal chest film with no impairment of pulmonary function, attributable to the welding fume exposure (Beckett, 1996). The welders with siderosis have shown gradual clearing of the X-ray with removal from exposure. In a 1978 survey of employed electric arc welders in Britain, 7% reported some degree of pneumoconiosis, but none showed progressive massive fibrosis (Artfield & Ross, 1976). On the contrary, functionally significant pulmonary fibrosis indicates that silica dust, nitrogen dioxide gas, or other components of the welding fume may lead to the more severe form of fibrosis in welders (Guidotti et al., 1978). The interstitial fibrosis, in the absence of silica in lung tissue, indicates that welding fume exposures, in the absence of silica, can lead to chronic interstitial pulmonary fibrosis (Funahashi et al., 1988). In vitro studies indicate that hexavalent chromium from stainless steel welding and nitrogen dioxide have been proposed as candidate causative substances (Stern et al., 1983). The most common type of welding, manual metal arc welding (MMA), when combined with stainless steel (MMA-SS), has been known to be associated with higher rates of emission of toxic compounds (Kalliomaki et al., 1986). It is also known to be more cytotoxic to macrophages and to induce a greater release of reactive oxygen species than fumes from other types of welding (Antonini et al., 1997, 1999).

Several attempts of inhalation or instillation exposures were made to induce lung fibrosis by exposing animals repeatedly to welding fumes (Hicks et al., 1983; Uemitsu, 1984; Kalliomaki et al., 1986), but the disease

process of lung fibrosis induced by welding fume exposure has not been elucidated. In previous study, we have developed a novel welding fume-generating system to expose experimental animals long-term (Yu et al., 2000). To study the pathological process of lung fibrosis, induced by welding fume exposure, these investigators developed a lung fibrosis model. After exposing MMA-SS welding to rats for 90 days the interstitial lung fibrosis was induced.

II. Materials and Methods

2.1. Generation of MMA-SS Welding Fume

The welding fumes were generated as described (Yu et al., 2000); that is, the fumes were generated with a rotating stainless disc (SUS 304, 50 mm diameter, 1 cm thickness) as the base metal, and a welding rod (KST 308, 26 x 300 mm, Korea Welding Electrode Co. LTD, Seoul) was restrained in the welding rod holder support. When the welding rod is moved by the pulley and approaches the rotating disc, an arc is produced and the rod is consumed, generating welding fumes. The fumes move into an exposure chamber (whole body type, 1.3 m³, Dusturbo, Seoul)

2.2. Measurement of Diameters of Welding Fume Particles

An Anderson sampler (AN-200, Shibata, Tokyo) was used to measure mass median aerodynamic diameters of welding fumes. The flow rate was 28.3 liters/min and the sampling time was 5 min.

2.3. Analysis of Welding Fumes

Welding fumes in the chamber were sampled with a personal sampler (MSA 484107, Pittsburgh) with a flow rate of 2 liter/min. The welding fumes particle captured on the membrane filters (pore size 0.8 μ m, 37 mm

diameter, Millipore AAWP 03700, Bedford) were analyzed for their metal composition with an Inductive Coupling Plasma analyzer (ThermoJeralash, IRIS, Houston) using NIOSH 7300 method (NIOSH, 1999). NIOSH method 7604 (1999) was used to evaluate Cr VI in the welding fumes. The samples for measuring total Cr were stored in vials containing base solution (2% NaOH, 2% Na₂CO₃). The samples for measuring Cr VI were kept in vials containing deionized water). Total Cr concentration was measured with an atomic absorption spectrophotometer (SpectAA-800, Varian, Palo Alto) after pretreatment of ashing with a microwave oven. Cr VI concentration was measured with an ion chromatography (DX-500, Dionex, Sunnyvale) after extractions of base and deionized water.

Gaseous fumes O₃, NO₂, and nitrous fumes, were measured by Dräger tubes (Cat No. 6733181, CH 31001, CH 30001, respectively). The gaseous fume were sampled by stroking a gas detector pump (6400000, Dräger, Lübeck), following manufactures direction, 1 hour after welding fume exposure was begun

2.4. Study of Inhalation Toxicity

Five-week-old male, specific pathogen-free Sprague Dawley rats purchased from the Charles River Laboratory (Japan) were acclimated to a 12-h light, 12-h dark cycle with light from 08:00 to 20:00 h. They were fed Purina Chow 5001 (Ralston Purina Co., St Louis, MO) and tap water ad libitum for 1 week before the initiation of the experiment. Rats weighing 134 ± 7 g were randomly assigned to six groups, exposed to welding fumes for 2 hr in the exposure chamber, and sacrificed either immediately, or 15, 30, 60, or 90 days after exposure. Each group consisted of 4 unexposed and 4 exposed rats. The TWA concentration of the exposure ranged 105–118 mg/m³ per 2hr.

2.5. Histopathology

After exposure, rats were anesthetized with diethyl ether, and blood was collected from the abdominal aorta. The lungs, trachea, and other organs including the adrenals, testes, heart, kidneys, spleen, liver and brain, were removed and fixed in a 10% formalin solution containing neutral phosphate buffered saline. Histological specimens from nasal pathways were prepared by the method described in Yu et al. (2000). Nasal pathways were gently flushed via the nasopharyngeal duct with a 10% neutral phosphate buffered formalin (NPBF). The samples were fixed in 10% NPBF for 7 days and delipidized by incubation with 70% methanol for 1 hour, methanol-chloroform (1:1) for one hour and 70% methanol for one hour. Samples were decalcified with 5% formic acid for at least 7 days and stored in NPBF until processing. Three histological sections were made from the proximal nasal pathway to the distal nasal pathway; incisor teeth, incisive papilla and molar teeth region. Specimens were embedded in paraffin, stained with hematoxylin and eosin (H&E), and examined by light microscopy. Some specimens were stained with Massons trichrome to visualize fibrosis (Carson, 1990).

III. Results

3.1. MMA-SS welding fume characterization

The aerodynamic diameters of welding fume particles are shown in Table 1. More than 90 % of fume particles had diameters less than 1 μ m. Fifty percent of them were distributed between 0.65 and 0.43 μ m. The MMA-SS welding fume consisted of mainly Fe, Mn, Cr, and Ni. The concentrations of metals and gaseous fractions of welding fumes are shown in Table 2.

3.2. Body weight development and animal observation

The rats exposed to welding fumes showed no statistically significant changes in body weight during the 90-day experiment. The welding fume-exposed animal did not show any distinct behavior changes.

3.3 Organ weight

As shown in Figure 1, total lung weight of the welding fume exposed rats showed significant weight increases ($P < 0.05$) compared to the lung weight of the control during the 90-day exposure period. The lung weight increase was evident from 15 of exposure and continuously increased until day 90. Comparing to the control, the lung weight increase

of the exposure group showed an initial sharp increase phase until 30 days, followed by a stable period between 30 and 60 days. Another sharp increase phase was noted between 60 and 90 days of exposure. Other organ weights, including adrenals, testis, kidneys, heart, spleen, liver and brain did not show significant increases in any of necropsy points (2hours, and at 15, 30, 60 and 90 days).

3.4. Gross and Histopathological Examination

The pleural surfaces of exposed rats showed white to grayish, and round elevated foci appeared on lung surfaces, with atrophy. Initially, this phenomenon is minor, and a tendency toward confluence can be observed. Types of fibrosis observed after 90 days of welding fume exposure are summarized in Table 3. Histopathological examination on the lung samples from 2-hour welding fume exposure showed particle-laden macrophages in the small bronchioles (Figure 2A, filled triangles) and no distinct fibrosis in the bronchioles or lung parenchyma (Figure 2C,). The 15 days, welding fume exposed lung, however, showed perivascularitis (Figure 2B, filled square) and delicate early fibrosis around peribronchioles and perivascular regions (Figure 2D, arrows) with trichrome staining to visualize fibrosis. The 30-day, welding fume exposed lungs showed particle laden macrophages in the alveolar spaces (Figure 3A, filled triangles) and early fibrosis around perivascular areas (Figure 3C, arrows). The particle-laden macrophages in the bronchioles appeared as alveolar lipoproteinosis or multifocal histiocytosis (see Weller, 1996). After 60 days of welding fume exposure, the lungs showed granulomatous regions and distinct fibrosis around perivascular and peribronchiole areas (Figure 3B, stars) and some interstitial fibrosis (Figure 3D, arrows). After 90 days of welding fume exposure, the welding fume particle-loaded macrophages filled in the alveolar spaces, and some macrophages accumulated many particles and

formed macules (Figure 4A, triangles). In addition, many granulomatous regions were observed (Figure 4B, stars) and interstitial fibrosis and peri-pleural fibrosis noted (Figure 4C, arrows). Histopathological examination on the nasal pathway, including squamous, transitional, respiratory and olfactory epithelium did not show any significant damage to the cells in the nasal pathway regions. Neither the trachea nor large bronchi showed any significant histopathological changes or adsorption of fume particles.

IV. Discussion

Previously, we have demonstrated that the welding fume particles were adsorbed mainly in the lower respiratory tracts, including bronchiols, alveolar ducts, alveolar sacs and alveoli when rats were exposed in short-term to our novel inhalation system (Yu et al., 2000). Taking advantage of capability in long-term exposure of welding fumes using our inhalation system, the present study demonstrated that a continuous exposure to MMA-SS welding fume induced interstitial fibrosis 60 days after the initial exposure. The exact causative agents for the lung fibrosis are not clear in our experiment, but both particulate fraction and gaseous fraction may contribute to the induction of fibrosis. Lung fibrosis, induced by welding fume exposure in our model, appeared to have three phases of particle accumulation process when the fume exposed lung weight was compared to the control. The first phase, from start to 30 days after the initial exposure, is the initial overloading phase, characterized with a rapid increase of lung weight. In this phase, perivascularitis with fibrosis began to appear in the perivascular and peribronchiolar regions. The recruitment of

macrophage to the alveolar airspace should have been the main event during this phase; however, the clearance by the macrophage may not have reached maximum capability to clear off the deposited fume particles. The second from day 30 to day 60, is the steady phase and is characterized by stagnancy of lung weight increase and equilibrium between overloading and clearance of the welding fume particles in the lung. Granulomatous regions and distinct fibrosis around perivascular and peribronchiole areas and some interstitial fibrosis were evident in this period. The recruitment of macrophage was in full force and the capability of clearance by the macrophage was maximized in this phase. Some macrophages are bursting after ingesting and accumulating fume particles in their cytoplasm, hence, macular shapes of macrophage-accumulated fume particles in their cytoplasm appear.

When the diameters were analyzed by an electron microscope, the particles were log normally distributed with diameters ranging from 0.023 to 0.81 μm , and had 0.1 μm geometric mean diameter (Yu et al., 2000). The 5 to 6 times discrepancy compared to the Anderson sampler measurements may be due to the density of fume particles. As seen in the short-term exposure (Yu et al., 2000), the welding fume particles are too small to be adsorbed in the nasal pathways and conducting airways in this 90-day exposure experiment. The effect of particles and gases on the nasal pathways and conducting airways are currently under investigation.

The gaseous fraction of the welding fume, Cr VI, ozone, nitrogen dioxide and nitrous fumes could additively or synergistically contributed the lung fibrosis. The exposure to 0.4 ppm ozone and 7 ppm nitrogen dioxide has induced pulmonary fibrosis from days 60 to 90 of exposure period (Ishii et al., 2000). Although the concentrations of ozone and nitrogen dioxide were lower in our experiment (0.1 and 0.5 ppm, respectively), the exposure to these gases could stimulate the particle exposure-induced lung fibrosis.

The activation of macrophages by ingesting fume particles or by exposing to the gaseous fractions of welding fumes may produce fibrogenic

cytokines without persistent inflammation of neutrophils (Ishii et al., 2000). In our experiment histopathological evaluation in the lung sections of rats in our experiment did not show any significant neutrophil response but indicated macrophage mobilization and response from the initiation of the exposure to day 90. Thus, the fibrosis caused by MMM-SS welding fume in our experiment could be originated from the factors released from the welding fume exposed macrophages.

V. References

Antonini. J. M., Krishna-Murthy. G. G., and Brain, J. D. (1997). Responses to welding fume: lung injury inflammation and release of tumor necrosis factor- alpha and interleukin-1 beta. *Exp. Lung Res.* **23(3)**, 205-227.

Antonini, J. M., Lawryk N. J., Murthy, G. G., and Brain, J. D. (1999). Effect of welding fume solubility on lung macrophage viability and function in vitro. *J. Toxicol. Environ. Health*, **58(6)**, 343-363

Artfield, M. D. and Ross, D.S. (1978). Radiologic abnormalities in electric-arc welders, *Br. J. Ind. Med.* **35**, 117-122.

Beckett W. S. (1996). Industries associated with respiratory diseases: Welding, Occupational and environmental respiratory diseases, pp 704-717. Harber P., Schenker M. B., Balmes, J. R. editors, Mosby, St. Louis, Missouri.

Carson, F. (1990). Histotechnology a self-instruction text, 1st Ed., 142-143,

- ASCP III. Funahashi, A., Schleuter, D., Pintar, K., Bemis, E. L., and Siegesmund, K.A. (1988). Welders pneumoconiosis: tissue elemental microanalysis by energy dispersive X-ray analysis, *Br. J. Ind. Med.* **45**, 14-18.
- Guidotti, T. L., Abraham, J. L., DeNes, P. B., and Smith, J. B. (1978). Arc welders pneumoconiosis: application of advanced scanning electron microscopy, *Arch. Environ. Health* **33**, 117-124,
- Hicks, R., Al-Shamma, K. J., Lam, H. F., and Hewitt, P.J. (1983). An investigation of fibrogenic and other effects of arc-welding fume particle deposited in the rat lung. *J. Appl. Tox.* **3**, 297-306.
- Ishii, Y., Hirano, K., Morishima, Y., Masuyama, K., Goto, Y., Nomura, A., Sakamoto, T., Uchida, Y., Sagai, M., Sekizawa, K. (2000). Early molecular and cellular events of oxidant induced pulmonary fibrosis in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **167**(3), 173- 81.
- Kalliomaki, P.C., Hyvarinen, H. K., and Aitio, A., (1986). Kinetics of the metal components of intratracheally instilled stainless steel welding fume suspensions in rats. *Br. J. Ind. Med.* **43**(2), 112-119.
- NIOSH, (1999). NIOSH manual of analytical methods, method No. 7300, 7604. Cincinnati
- Stern, R. M, Pigott, G. H., and Abraham, J. L. (1983). Fibrogenic potential of welding fumes, *J. Appl. Toxicol.* **3**, 18-30.
- Uemitsu, N., Shimizu, Y., Hosokawa, T., Nakayoshi, H., Kobayashi, M., Minato, S., Ogawa, T., and Tsutsumi, S. (1984). Inhalation toxicity study of

welding fumes: effect of single or repeated exposure on the lungs of rats. *Toxicology* 30, 75-92.

Weller, W., (1996). Alveolar lipoproteinosis, rat. Monographs on pathology of laboratory animals: Respiratory system. Jones, R.C., Dungworth, D.L., Mohr, U. editors. Springer, NY.

Yu I. J., Kim, K. J., Chang, H. K., Song, K. S., Han, K. T., Han, J. H., Maeng, S.H., Chung, Y. H., Park, S.H., Chung, K. H., Han, J. S., and Chung H. K. (2000), Pattern of deposition of stainless welding fume particle inhaled into the respiratory systems of Sprague-Dawley rats exposed to a novel welding fume generating system, *Toxicology Letters* **116**, 103-111.

스테인레스 스틸 용접흡 폭로에 의한 폐섬유화 연구
(연구원 2001-23-63)

발 행 일 : 2000년 12월 31일

발 행 인 : 산업안전보건연구원 원장 정 호 근

연구책임자 : 산업안전보건연구원 산업화학물질연구센터 책임연구원 유일재

발 행 처 : 한국산업안전공단 산업안전보건연구원

주 소 : 인천광역시 부평구 구산동 34-4

전 화 : (032) 5100 - 842

F A X : (032) 5180 - 867
