

입자 및 섬유상 물질의 독성시험법 개발 연구

- 석면 및 석면대체물질의 독성평가연구 -

한 국 산 업 안 전 공 단
산업안전보건연구원

제 출 문

한국산업안전공단 이사장 귀하

본 보고서를 2001년도 산업안전보건연구원 연구사업인 “입자 및 섬유상 물질의 독성시험법개발 연구”의 연구결과 최종보고서로 제출합니다.

2001년 12월 31일

연구주관부서 : 산업안전보건연구원 산업화학물질연구센터

연구 책임자 : 수석연구원 유 일 재

공동 연구자 : 정 용 현, 한 정 희, 송 경 석, 신 영 민

요 약 문

1. 과 제 명 : 입자 및 섬유상 물질의 독성시험법 개발 연구

2. 연구기간 : 2001년 1월 1일 - 2001년 12월 31일

3. 연 구 자 : 총괄연구책임자 : 유 일재 (수석연구원)

공 동 연 구 자 : 정 용현 (기술직 3급)

: 한 정희 (기술직 5급)

: 송 경석 (연구보조원)

: 신 영민 (연구보조원)

4. 연구목적

본 연구에서는 현재 국내에 수입되고 있는 석면대체물질을 분석하여 이들의 성분과 기존 석면과의 차이점을 밝히고 석면대체물질의 생체 폭로 시험을 통한 독성을 규명하고자 석면대체물질로 알려진 TAFMAG, Calidria RG-144, Calidria RG-444을 TEM-EDX (에너지 분산장치가 장착된 투과전자현미경)을 이용하여 성상과 성분을 분석하고, 이 물질들을 실험동물의 기도에 투여(Instillation) 하여 3일, 60일 90일 이후에 폐에서의 생체지속성 (biopersistence)과 투여에 의한 폐의 조직병리변화를 관찰하여 석면대체물질의 독성을 조사하였다.

5. 연구내용

석면 대체물질 3종 (TAFMAG, Calidria RG-144, Calidria RG-444)의 전자현미경 시료를 만들어 이들의 성상과 성분을 조사한 결과 이 석면대체물질 3종은 백석면 (chrysotile) 과 동일한 성상과 성분을 가진 것으로 밝혀졌다. 석면 대체물질의 독성과 생체지속성 (biopersistence)을 조사하기 위해 실험동물 흰쥐에게 석면이나 석면 대체물질 3종 (TAFMAG, Calidria RG-144, Calidria RG-444)을 2mg/rat 농도로 흰쥐의 기도에 투여하였다. 투여후 3일 30일 90일 경과 후 폐의 중량을 측정하고, 폐의 조직병리표본을 작성하여 폐의 병리 변화를 관찰하였고, 폐 조직을 저온회화 처리하여 폐내 석면 및 석면 대체물질 길이와 직경을 조사하여 biopersistence를 조사하였다. 기도 내 주입 (Instillation)을 이용한 독성시험법에 의해 TAFMAG, Calidria 144, Calidria 444를 주입후 90일이 경과한 동물의 폐는 석면과 동일하거나 심각한 폐내 반응, alveolar septal thickening, granuloma formation, macrophage mobilization등의 반응을 일으켰으며. 기도 주입 후 90일 경과한 동물의 폐에서의 석면 및 대체물질의 길이와 직경의 변화를 조사한 결과, 석면과 Calidria RG-144는 섬유 길이와 직경에 아무런 유의성 있는 변화를 보여주지 않았으나, TAFMAG과 Calidria RG-444 같은 대체물질들은 섬유의 길이에 변화가 없었으나 통계적으로 유의한 ($p<0.01$) 섬유 직경의 감소를 보여주었다.

6. 활용계획

석면대체물질의 성분 및 성상을 분석하는 방법을 확립하였으며, 석면대체물질의 유해성을 단기간에 검정하는 방법으로 기도내 주입법을 확립하여 석면대체물질에 의한 폐 조직병리와 생체지속성 (biopersistence)에 의한 석면

대체물질의 유해성평가방법을 확립하였다. 이 방법을 이용하여 향후 국내에 유통되는 석면대체물질이나 새로이 수입되는 석면대체물질을 평가하여 석면 및 석면관련물질의 규제의 근거로 사용이 가능하리라고 본다

7. 연구개요

본 연구에서는 현재 국내에 수입되고 있는 석면대체물질을 분석하여 이들의 성분과 기존 석면과의 차이점을 밝히고 석면대체물질의 생체 폭로 시험을 통한 독성을 규명하고자 면 대체물질 3종 (TAFMAG, Calidria RG-144, Calidria RG-444)의 전자현미경 시료를 만들어 이들의 성상과 성분을 조사한 결과 이 석면대체물질 3종은 백석면 (chrysotile) 과 동일한 성상과 성분을 가진 것으로 밝혀졌다. 석면 대체물질의 독성과 생체지속성 (biopersistence) 을 조사하기 위해 실험동물 흰쥐에게 석면이나 석면 대체물질 3종 (TAFMAG, CAalidria RG-144, Calidria RG-444)을 2mg/rat 농도로 흰쥐의 기도에 투여하였다. 투여 후 3일 30일 90일 경과 후 폐의 중량을 측정하고, 폐의 조직병리표본을 작성하여 폐의 병리 변화를 관찰하였고, 폐 조직을 저온회화 처리하여 폐내 석면 및 석면 대체물질 길이와 직경을 조사하여 biopersistence를 조사하였다. 기도 내 주입 (Instillation)을 이용한 독성시험법에 의해 TAFMAG, Calidria 144, Calidria 444를 주입 후 90일이 경과한 동물의 폐는 석면과 동일하거나 심각한 폐내 반응, alveolar septal thickening, granuloma formation, macrophage mobilization등의 반응을 일으켰으며. 기도 주입 후 90일 경과한 동물의 폐에서의 석면 및 대체물질의 길이와 직경의 변화를 조사한 결과, 석면과 대체물질은 섬유 길이에는 아무런 유의성 있는 변화를 보여주지 않았으나 통계적으로 유의한 ($p<0.01$) 섬유 직경의 감소를 보여주었다. 석면 대체물질 3종의 독성은 chrysotile과 비교하여 폐내 조직병리와 생체지속성이 거의 유사한 물질로 밝혀졌다.

8. 중 심 어

석면대체물질, 기도 내 주입시험 (Instillation), chrysotile, TAFMAG, Calidria RG-144, Calidria RG-444.

차 례

I. 서론.....	1
II. 재료 및 방법.....	5
1. 석면.....	5
2. 석면대체물질.....	5
3. 시료의 제작.....	6
4. 석면 및 석면대체물질 분석방법.....	7
5. 실험동물.....	8
6. 석면대체물질의 기도 내 주입.....	8
7. 폐 내 fiber의 특성화.....	9
8. 조직병리표본제작.....	9
III. 연구결과.....	10
1. 석면의 분석.....	11
2. 석면 대체물질의 분석.....	11
3. 석면 및 석면 대체물질 기도 주입 후 폐의 무게변화.....	13
4. 석면 및 석면대체물질 주입한 폐에서의 조직병리.....	14
5. 석면대체물질의 폐 내 Biopersistence.....	22
IV. 고찰.....	24
V. 결론.....	25
VI. 참고문헌.....	26

제 1 장 서 론

석면 (asbestos)은 자연계에서 산출되는 섬유상 광물질의 총칭으로 인장내력과 유연성이 뛰어나고, 불연성과 내마모성, 절연성 등의 여러 가지 특성 때문에 석면제품은 우리 일상생활에 대단히 유용한 물질로 사용되고 있으나 (Green & Churg, 1998), 인체에 석면폐 (asbestosis), 중피종 (mesothelioma), 폐암 (lung cancer) 등을 유발하는 물질이기 때문에 산업안전보건법에 특별한 관리가 요구되는 금지물질, 허가물질, 특정화학물질로 지정되어 있다 (노동부, 2000).

산업적으로는 1940년대부터 미국을 비롯한 여러 선진국에서 석면이 건강에 미치는 영향이 알려지지 않은 채 건축용 시멘트를 비롯한 군함의 단열재로 많이 이용되어 왔으나 20년이 지난 1960년대 이후 석면에 폭로되었던 많은 근로자 중에서 중피종, 폐암 등의 암과 석면폐가 많이 발생되어 석면의 유해성이 알려지게 되었다 (Selikoff & Lee, 1978).

우리나라에서는 1945년 당시 16개의 석면광산이 있었으나 1983년 홍성의 석면광산이 마지막으로 문을 닫았다 (Yu et al., 1998). 대부분의 석면은 캐나다에서 수입되고 있으며 아주 적은 량의 황석면 (amosite)이 짐바브웨 (Zimbabwe)에서 수입되었다고 한다 (Yun & Kim, 1991). 1970년 근대화 물결이 시작되면서 새마을 운동의 일환으로 초가지붕을 석면이 함유된 슬레이트로 지붕개량을 하면서 석면이 사용되기 시작하여 1980-1990년대로 산업화가 급속히 진행하면서 석면의 사용량이 1995년에는 88722톤 가량을 수입하게 되었다. 한국에서의 석면의 사용은 건축자재 (82.3%), 마찰재로 브레이크 라이닝 (10.5%), 석면방직 (5.1%)로 사용되고 있다 (Yu et al., 1998).

석면에 의한 직업병은 1993년 악성중피종이 발견된 이래 2001년까지 공식적으로 17건의 직업성 암이 발견되었다 (Lee, 2001). 석면의 폭로 후 평균 20년 평균 이후 석면관련 직업병이 나타나는 것으로 보아 대규모 석면사용30년이 지난 상황에서 앞으로 석면관련 직업병이 많이 발생할 것으로 예측된다.

노동부에서는 석면관련 규정을 개정하여 황석면 (amosite) 및 청석면 (crocidolite)을 금지물질로 지정하여 제조, 수입, 사용을 금지한 바 있으며 2002년부터는 석면을 함유한 건축자재를 해체하는 작업을 허가제로 하려는 규정을 입법예고 한바 있으며 석면의 작업환경노출기준을 현행 2 fiber/cc에서 20배 낮추어 0.1 fiber/cc로 2003년부터는 개정하고자 입법예고 한바 있다 (Lee, 2001).

석면의 분석하는 방법에는 광학현미경법 (Kohyama, 1987), 위상차현미경법 (phase contrast microscopy, PCM) (강보영 등 1991; Schlecht & Schulman, 1995; NIOSH, 1994), 편광현미경 (polarized microscopy, PLM) (백남원 과 이영환, 1991; NIOSH, 1994), Scanning electron microscopy (주사현미경, SEM) (Robertson et al., 1992), transmission electron microscopy (투과전자현미경, TEM), (Steel and Small, 1985; Kohyama, et al., 1993; NIOSH, 1994) 등 여러 가지 방법이 있으나 아직 우리나라에서는 석면 분석시 PLM 과 PCM 방법을 많이 사용하고 있다 (유성환과 김현욱, 1996). PCM 및 PLM 법은 석면 종류의 정확한 분석이 어려우며 크기가 작은 석면 섬유를 광학현미경으로는 관찰하기가 힘들기 때문에 석면의 정확한 분석은 TEM에 에너지 분산 X-선 분석장치 (energy dispersive X-ray analyzer, EDX)를 장착한 방법을 사용하도록 EPA나 NIOSH에서는 권유하고 있다, TEM이 PCM 보다는 50-70 배 정도에서 4배 정도로 정확히 측정할 수 있다고 하며 TEM에 장착된 EDX를 사용하여 극미량의 원소도 정확히 분석할

수 있으며 전자회절상 (electron diffraction)을 이용하여 석면고유의 결정체 구조로 석면의 종류를 구별할 수 있다 (Verma & Clark, 1995; Kohyama & Kurimori, 1996).

석면의 규제로 석면대체물질로 MMMF (man made mineral fiber)가 사용되고 있는데 MMMF는 크게 4종류로 구분 수 있다 (1) Continuous filament, (2) Insulation wool: glass wool, rock wool, slag wool (3) Refractory fibers: ceramic fibers (4) Special purpose fibers: glass microfibers 등이 있는데 이들은 성분과 제조 방법의 차이와 fiber의 직경 (diameter)에 의해 구분될 수 있다 (IPCS, 1988). 이들의 동물실험을 통한 유해성은 알려져 있으나 아직 석면과 비교하여 사용기간이 짧아 인간에 대한 유해성은 앞으로 더 많이 연구되어야 할 과제이다. 이런 MMMF가 아닌 석면 대체물질이 최근 국내에 수입되어 다양한 용도로 사용되고 있는데 이들의 유해성은 전혀 알려지지 않고 있다.

석면대체물질의 유해성을 규명하기 위해서는 in vitro와 in vivo 시험이 권유되고 있으나 in vitro 시험은 간편한데 비해 결과를 생체에 적용하기 어려운 점이 있어 in vivo 시험이 많이 사용된다. In vivo 시험은 동물에게 석면 대체물질을 흡입시켜서 하는 방법이 많이 사용되고 있지만 이를 위해서는 환경과 실험자를 보호하기 위한 안전장치가 필요하다, 특히 전신 폭로 시 노출에 사용된 석면대체물질이 시험동물의 모발에 부착되어 있다가 동물관리 및 취급 시나 실험종료 후 동물해부 시 시험자에게 노출될 위험이 있으므로 최상의 안전장치가 필요하다. 따라서 nose-only나 head-only 폭로 기법이 필요하나 이는 많은 동물취급 시 인력과 시간이 소요된다. 흡입실험장치와 별도의 안전장치가 없이 실시할 수 있는 기법으로는 주입 (instillation) 기법이 권유되고 있다 (Bellmann & Muhle, 1997, Bellmann et al., 1994). 일정한 석면대체물질을 마취한 동물의 기도내에 주입하여 폐의 조직병리학적 변화나, 석면대체물질의 거동을 살펴보는 방법으로 EU에서는 석면이나 대체

물질의 독성실험 대체실험방법으로 권유하고 있는 실정이다 (Pratt et al., 1999). 이 따라서 본 시험에서는 석면대체물질을 동물의 기도에 주입 (instillation)하는 방법을 사용하여 석면대체물질에 의한 폐의 조직변화와 거동을 살펴보고자 한다.

이 연구의 목적은 (1) 현재 국내에 수입되고 있는 석면대체물질을 분석하여 이들의 성분과 기존석면과의 차이점을 밝히고 (2) 석면대체물질의 생체폭로 시험을 통한 독성을 규명하고자 한다.

제 2 장 재 료 및 방 법

1. 석면

석면표준품은 General Science Corporation(Tokyo, Japan)에서 구입한 UICC (International Union against Cancer) 표준품인 chrysotile을 사용하였다.

2. 석면대체물질

석면대체물질은 국내에 수입된 석면대체물질 3종을 분석하고 독성시험에 이용하였다. 이들의 수입처와 성상은 Table 1과 같다.

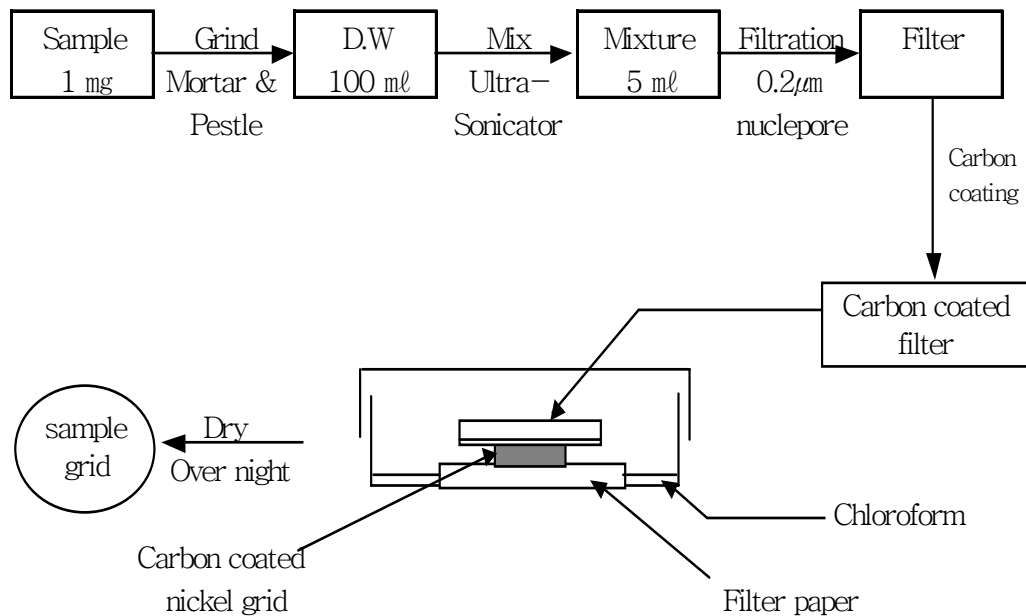
Table 1. Characteristics of asbestos substitutes.

	Origin	Bed Rock	Fiber diameter	Fiber length
TAFMAG	China	Serpentine	0.025 μ m	5 μ m
Calidria RG-144	USA 160 mile south of San Francisco	Serpentine	0.025 μ m	5 μ m
Calidria RG-444	미국 160 mile south of San Francisco	Serpentine	0.025 μ m	5 μ m

3. 시료의 제작

시료는 Sakai의 시료제작방법을 참고로 하여 (Sakai et al., 1991) 표준시료를 각각 mortar와 pestle로 잘게 분쇄하여 증류수 100 ml가 들어있는 병에 소량 (약 1 mg)을 넣고 2시간 동안 초음파로 분산한 후 그 혼합물을 polycarbonate membrane filter (Millipore #GTTTP02500, nuclepore filter, pore size $0.2\ \mu\text{m}$, diameter 25 mm)에 흡입여과 하였다. 여과시킨 filter를 건조한 후 얇게 탄소막을 입혀 그 중 일부 (약 3 mm)를 잘라내어 탄소막이 입혀진 nickel grid (SPI #2020N, diameter 3 mm, 200 mesh) 위에 놓고 chloroform vapor를 이용하여 filter를 용해하여 제거하였다. 하룻밤 정도 두어 건조시킨 후 이 sample grid를 Energy dispersive X-ray analyzer (EDX; Kevex 7000Q)가 장착된 투과전자현미경 (TEM; transmission electron microscope) (Hitachi H-7100FA)을 사용하여 분석하였다 (Figure 1).

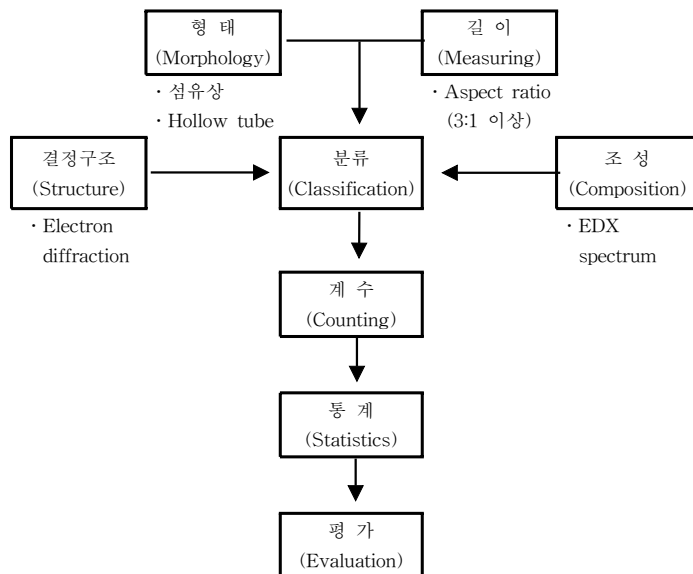
Figure 1. Specimen preparation method of TEM-EDX analysis.



4. 석면 및 석면대체물질 분석방법

시료는 EDX가 장착된 TEM으로 분석하였다. 가속전압은 100 kv로 하였고 시료를 넣고 저배율로 확대하여 좋은 시야상을 선택한 후 고배율로 확대하여 그 형태와 길이를 자세히 관찰하였다, 석면의 특징인 섬유형태를 가지며 길이와 직경의 비 (aspect ratio)가 3:1 이상인 지를 관찰하였다. 그리고 fiber의 EDX spectrum을 얻어 구성원소와 성분비를 조사하였다, EDX는 시료에 전자빔을 조사했을 때 방출하는 X-선을 peak 형태로 나타내어주는 장비인데 원소마다 고유의 spectrum을 가지고 있기 때문에 정성분석과 정량분석을 할 수 있다. 석면은 결정체 구조이므로 전자회절 pattern을 파악하여 석면의 종류를 평가하였다. Figure 2에는 석면의 종류를 평가하는 방법을 나타내었다.

Figure 2. Analytical method of asbestos.



5. 실험동물

SPF (Specific pathogen free) 수컷 Sprague-Dawley rat 6주령 150 마리를 Biogenomics에서 구입하여 2주일 순화하였다. 실험동물은 실험 전에 2주간의 순화기간을 거쳐 사육환경에 적응하도록 하였다. 동물사육실의 온도는 20-26°C 였고, 상대습도는 40-60% 였다. 동물은 퓨리나 설치류 사료를 구입하여 정제수와 같이 부족함이 없이 공급하였다. 동물사육은 폴리카보네이트로 만들어진 케이지 당 3-4 마리씩 분리 사육하였다. 시험개시 1주일 전에 체중을 측정하여 아래의 Table 2와 같은 군으로 나누었다.

Table 2. Experimental animal group.

	3 day	1 month	3 months	6 months	12 months
Chrysotile ^a	5	5	5	5	5
TAFMAG	5	5	5	5	5
Calidria RG-144	5	5	5	5	5
Calidria RG-444	5	5	5	5	5
TiO ₂ ^b	5	5	5	5	5
Control	5	5	5	5	5

Total 150 + 10 (예비용)

a: positive control for biopersitence

b: negative control for biopersistence

6. 석면대체물질의 기도 내 주입 (Instillation)

실험동물은 Ketamin 마취 후 autoclave로 살균된 석면 (positive control) 및 석면대체물질, TiO₂ 등을 만들어 syringe를 이용하여 동물 1마리당 2 mg/0.3 ml in saline 농도로 기도에 주입하였다 (Bellmann & Muhle,

1997). 주입 후 3일, 1개월, 3개월, 6개월, 12개월 후에 동물을 희생하여 체중, 폐 무게를 측정한 후 10% 중성 포르말린에 고정하였다. 각 군 당 2마리는 폐 조직병리 표본 작성을 위해 사용되었고, 3마리는 fiber clearance 시험을 위한 표본으로 사용하였다.

7. 폐 내 fiber의 특성화

기도내 주입되어 폐에 존재하는 fiber들은 시험기간 종료 후 희생된 동물의 폐 조직에서 fiber를 고정하여 fiber의 크기 및 숫자를 개수하였다. 10% 중성 포르말린에 고정되어 보존된 폐 조직을 잘게 잘라서 공기 중에 건조시킨 뒤 dry oven에 overnight 건조시켰다. 건조된 폐 조직은 무게를 측정한 후 저온회화기 (Low Temperature Plasma Asher, Yamato, Japan)에 산소를 공급하면서 over night 회화하였다. 회화된 물질들은 fiber free 증류수에 녹여 nucleopore filter에 여과하여 고정한 후 전자현미경 sample로 작성하였다. 각 동물의 폐 시료에서 50개의 fiber에서 길이와 직경을 측정하였다.

8. 조직병리표본제작

폐 조직은 10% 중성포르말린에 고정한 후 파라핀에 포매한 후 Hematoxylin-Eosin (H-E) staining으로 염색하여 현미경에서 관찰하였다.

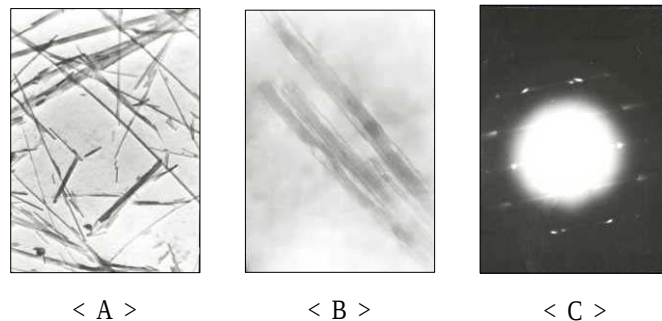
제 3 장 연구결과

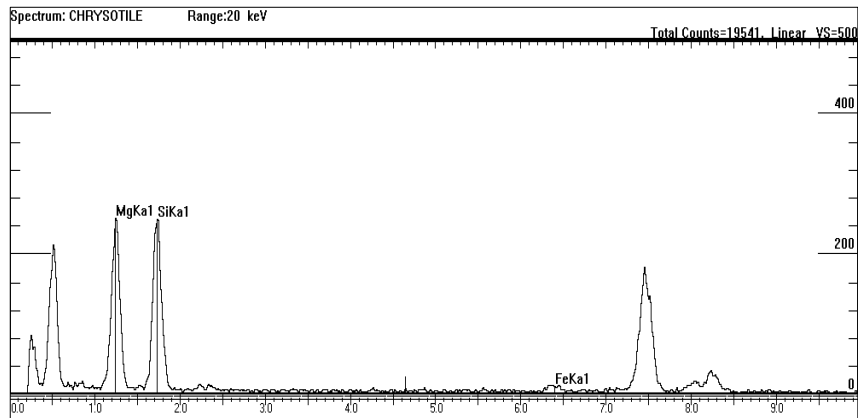
1. 석면의 분석

석면은 모두 침상결정의 가늘고 긴 fiber로 이루어져 있었고 결정구조를 가지고 있어 각 석면의 고유한 결정구조를 파악할 수 있었다. 사문석 계열인 chrysotile은 다른 각섬석 계열의 석면과는 다른 독특한 성상을 가지고 있어 쉽게 구별할 수 있었다. 10,000배에서 관찰했을 때 fiber는 가늘고 길며 굽어진 모양을 가지고 있었으며, 끝 부분은 대체로 갈라져 있었다 (Figure 3A). Fiber를 200,000배정도의 고배율로 확대하면 중앙에 chrysotile 특유의 관모양의 구조를 볼 수 있었다. 이것을 hollow tube 구조라고 하며 chrysotile에만 특징적으로 존재한다 (Kohyama et al., 1993) (Figure 3B). 그리고 chrysotile은 다른 종류의 석면과는 다른 독특한 전자회절상 패턴을 보여주었다 (Figure 3C). EDX로 분석한 결과 주성분은 Mg와 Si였으며 Fe를 소량 함유하고 있었다 (Figure 3D).

Figure 3. Morphology of chrysotile fibers, electron diffraction pattern, and EDX spectrum of chrysotile fibers.

A, 10,000배; B, 200,000배; C, electron diffraction; D, EDX spectrum



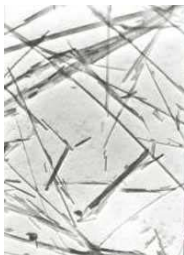
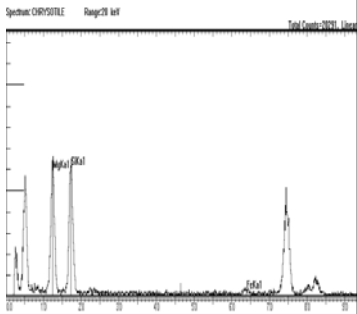
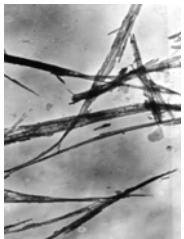
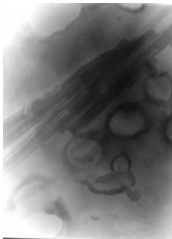
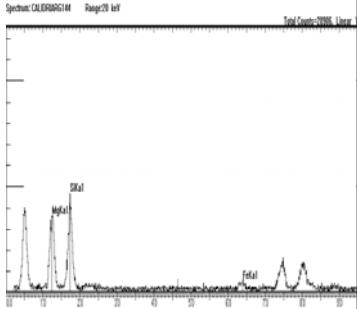
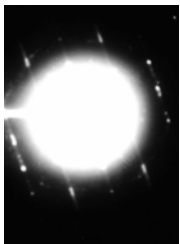
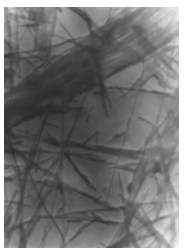
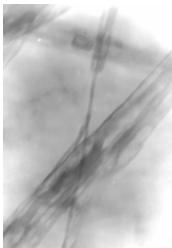
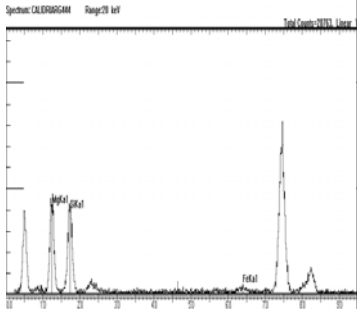
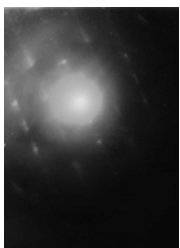
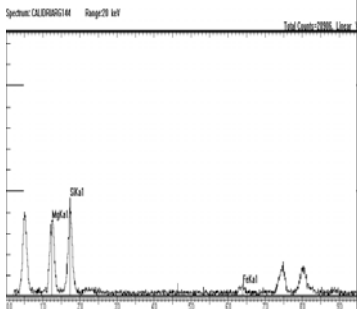


< D >

2. 석면대체물질의 분석

석면대체물질로 수입된 TAFMAG, Calidria RG-144, Calidria RG-444는 대부분 $5\mu\text{m}$ 이상의 섬유상 물질이었으며 EDX spectrum pattern과 electron diffraction pattern도 chrysotile과 동일하였으며 chrysotile 특유의 hollow tube structure를 가지고 있어 3종의 석면대체물질들은 chrysotile계의 물질로 생각된다 (Figure 4).

Figure 4. Morphology, EDX spectra and electron diffractions patterns of asbestos substitutes.

	Morphology	Hollow tube structure	EDX spectrum	Electron Diffraction
Chrysotile				
Calidria RG-144				
Calidria RG-444				
TAFMAG				

3. 석면 및 석면 대체물질 기도 주입 후 폐의 무게변화

석면 및 석면 대체물질을 기도에 주입 후 3일, 30일, 90일, 180일 후 폐를 적출하여 무게를 측정한 후 병리표본작성과 생체지속성을 조사하기 위한 전자현미경 시료를 작성하였다. 폐의 무게 변화는 아래의 Table 3과 같다. 통계적으로 유의한 폐의 무게변화는 관찰되지 않았다.

Table 3. Lung weight changes after instillation of asbestos substitutes.

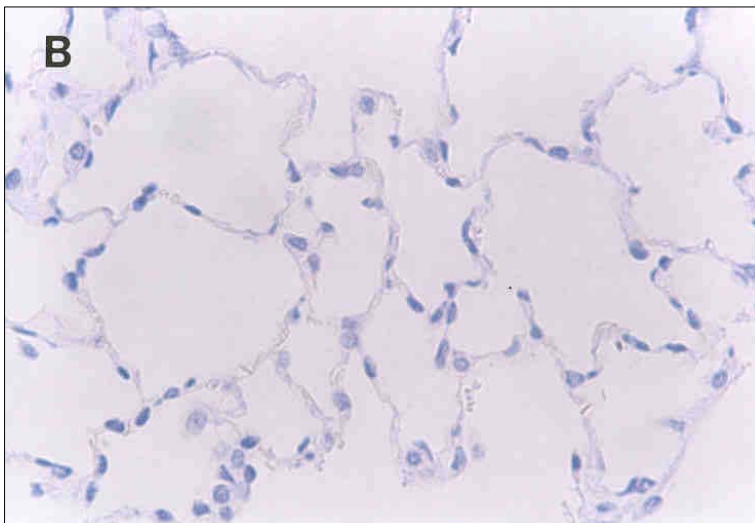
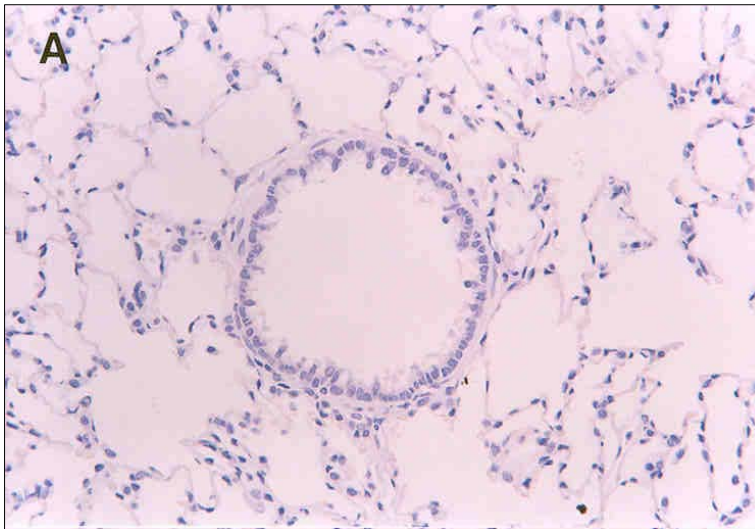
	3 days	30 days	90 days	180 days
Control				
L	336±25	466±26	548±40	617±60
R	630±59	895±67	1132±225	1159±119
Chrysotile				
L	323±34	480±36	571±60	575±20
R	620±31	876±78	1063±221	1101±65
TiO ₂				
L	333±8	463±49	532±43	582±60
R	611±81	842±55	980±79	1110±93
TAFMAG				
L	356±35	461±22	522±21	561±40
R	654±43	863±65	1015±83	1128±126
Caldiria RG-144				
L	349±45	451±45	502±76	569±77
R	651±73	881±79	950±78	1096±92
Calidria RG-444				
L	366±64	483±53	544±22	584±46
R	726±175	947±184	1057±119	1142±64

4. 석면 및 석면대체물질 주입한 폐에서의 조직병리

석면 및 대체물질 주입 3일 경과 후에는 대조군과 비교하여 (Figure 5) 폐에서의 특징적인 조직병리학적 소견을 발견되지 않았다. 그러나 석면 및 대체물질의 주입에 따른 macrophage의 이동은 관찰되었다.

Figure 5. 대조군의 폐 조직.

A: 100x, B: 200x

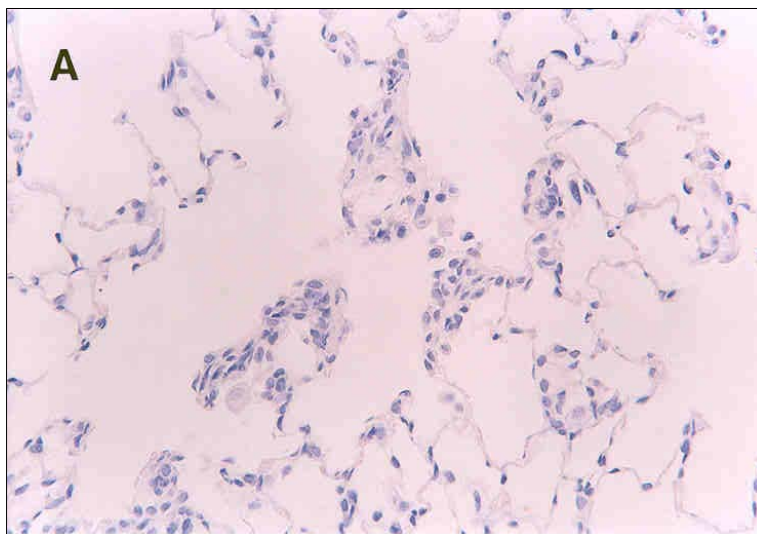


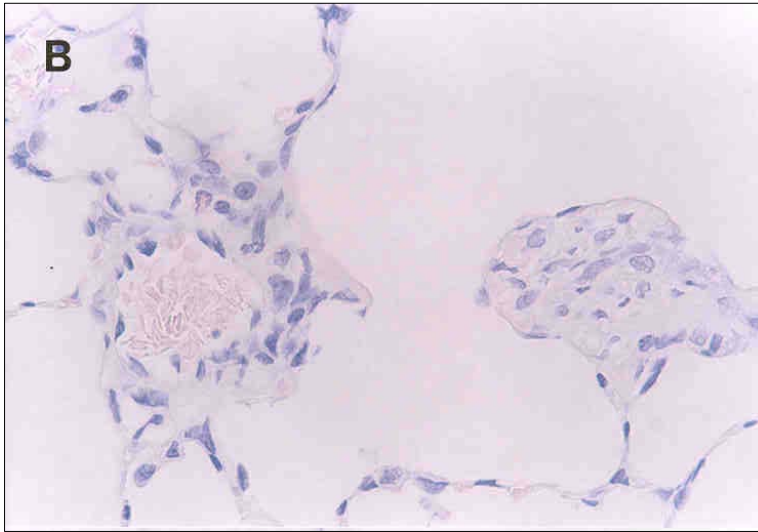
Chrysotile, TiO_2 , TAFMAG, Calidria RG-144, Calidria RG-444를 주입한 후 30일 경과한 동물의 폐에서는 alveolar septum에서 미세한 비후와 macrophage의 mobilization이 관찰되었다 (figure not shown).

Chrysotile 주입 후 90일 경과한 동물의 폐에서는 alveolar의 septum에서의 미세한 focal granuloma와 small bronchiole의 주위 (peribronchiolar region)에서 focal granuloma와 perivascularitis가 관찰되었다 (Figure 6). Macrophage들의 fiber 탐식을 위한 alveolar로의 mobilization 도 관찰되었다.

Figure 6. Chrysotile 주입 후 90일 후의 폐 조직.

A: 100x, B: 200x.

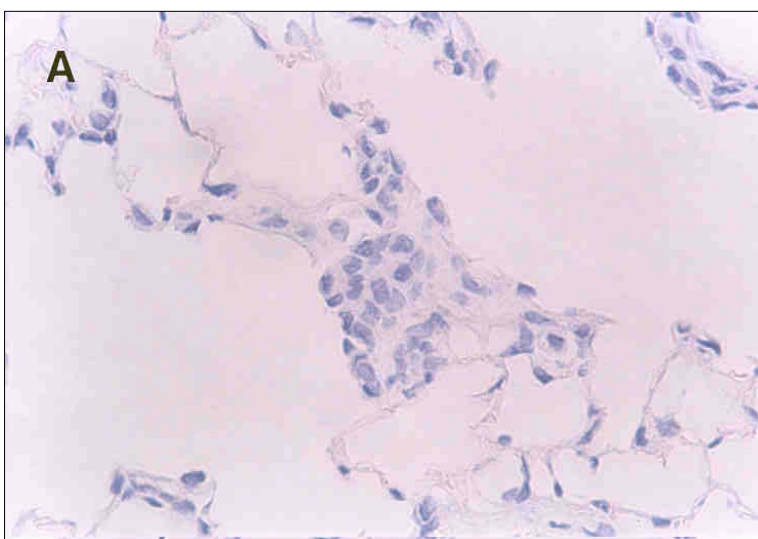


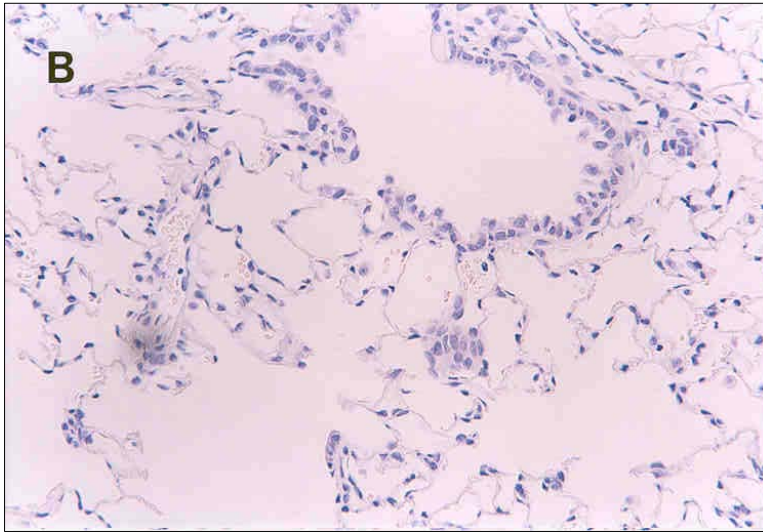


TiO₂ 주입 후 90일 경과한 동물의 폐에서는 alveolar의 septum에서의 미세한 focal granuloma가 관찰되었으며 Small bronchiole의 주위 (peribronchiolar region)에서 focal granuloma가 관찰되었다 (Figure 7).

Figure 7. TiO₂ 주입 90일 후의 폐조직.

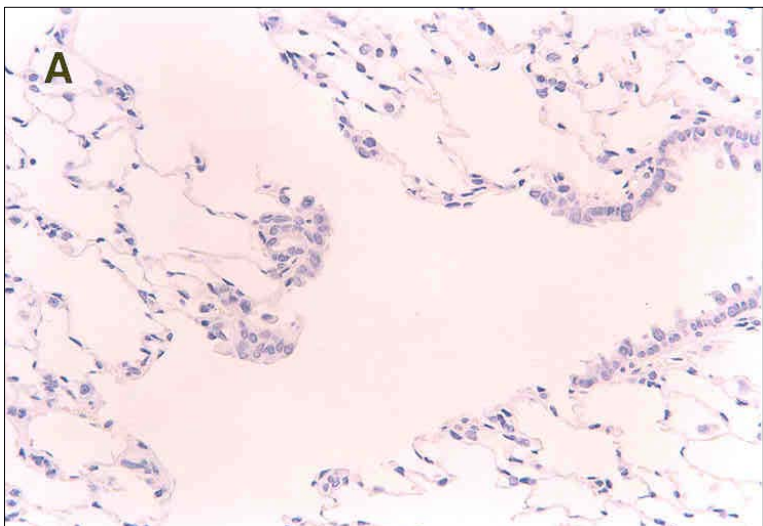
A: 200x, B: 100x.

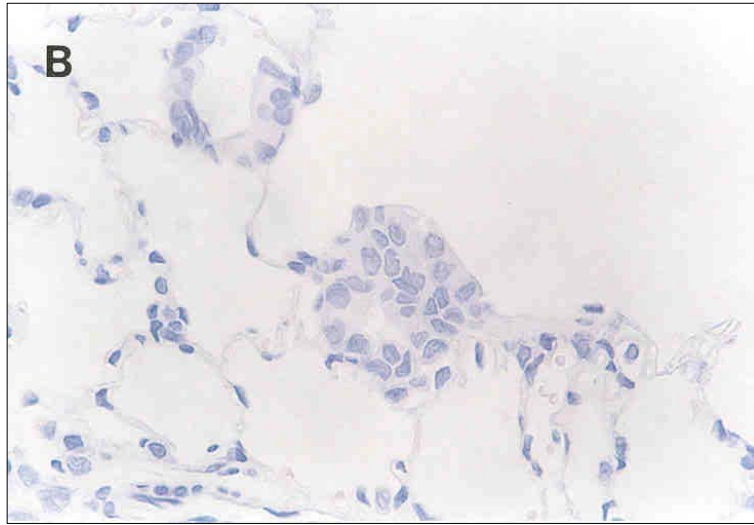




TAFMAG 주입 후 90일 경과한 동물의 폐에서는 alveolar duct에서의 granuloma들이 관찰되었으며 alveolar septa의 비후를 관찰할 수 있었다. (Figure 8).

Figure 8. TAFMAG 주입 후 90일 후의 폐 조직병리.

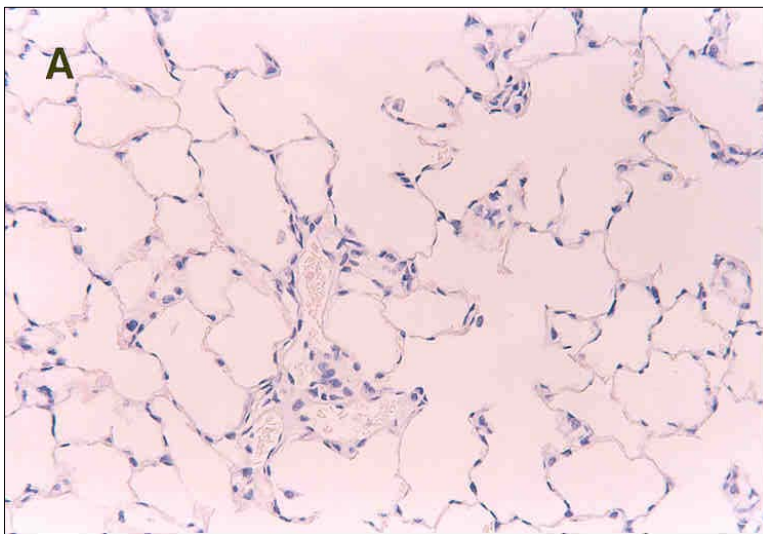


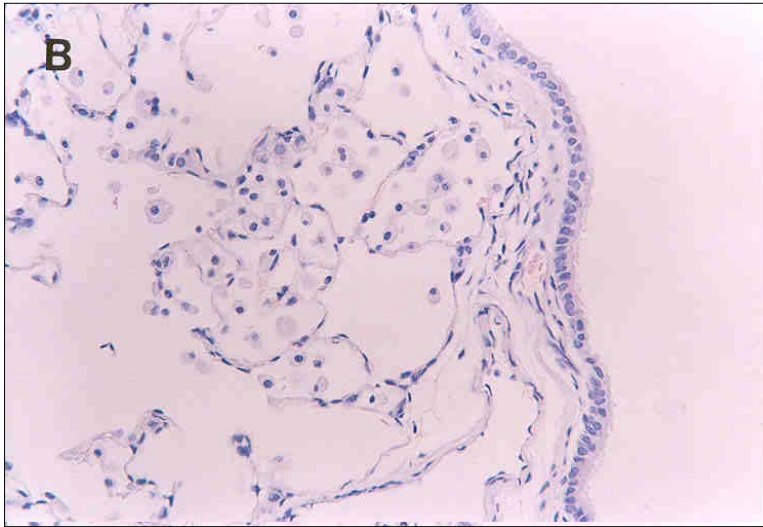


Calidria RG 144를 주입 후 90일이 경과한 동물의 폐에서는 multiple focal granuloma가 관찰되었으며 alveolar septa의 비후를 관찰 할 수 있었으며 (Figure 9A), macrophage의 mobilization도 관찰되었다 (Figure 9B).

Figure 9. Calidria RG 144 주입 90일 후의 폐조직.

A: 100x, B: 200x.

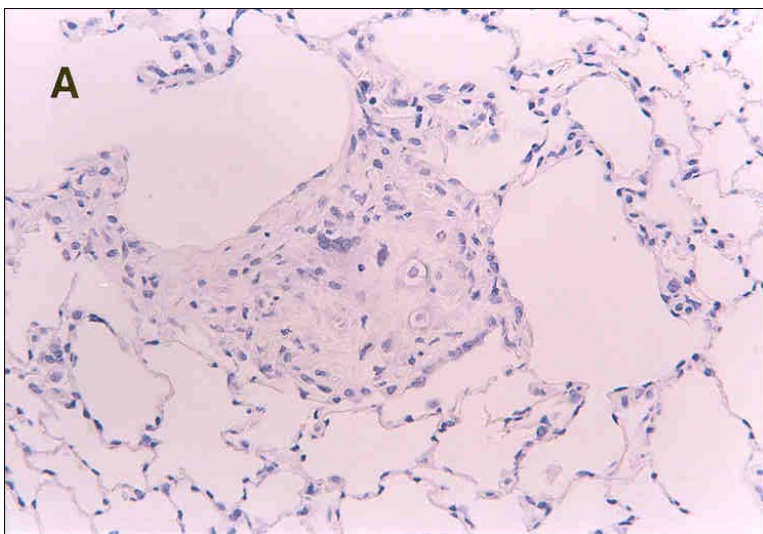




Calidria RG 444 주입 후 90일이 경과한 동물의 폐에서는 alveolar duct 중위에서 small nodular type의 granuloma가 관찰되었으며 (Figure 10 A) alveolar duct의 비후 (Figure 10 B)가 관찰되었으며 fibrosis가 진행된 부분도 관찰되었다 (Figure 11A). Macrophage의 lipidosi도 관찰되었다 (Figure 11B).

Figure 10. Calidria RG 44 주입 90일 후의 폐조직.

A: 200x, B: 100x



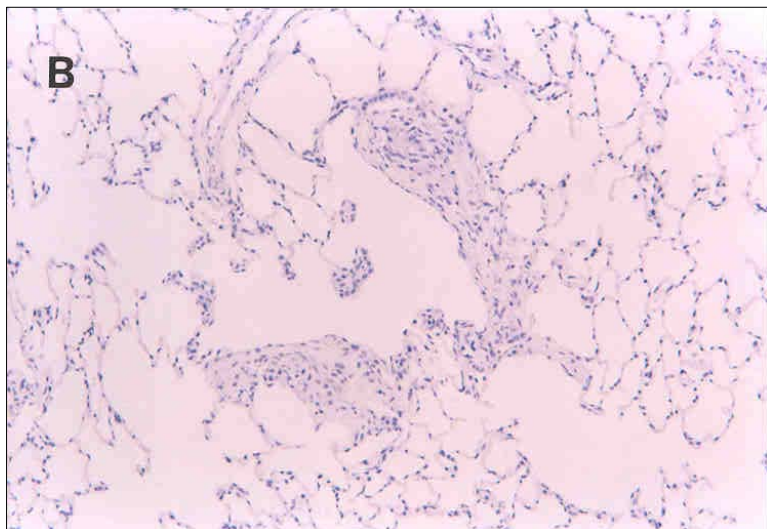
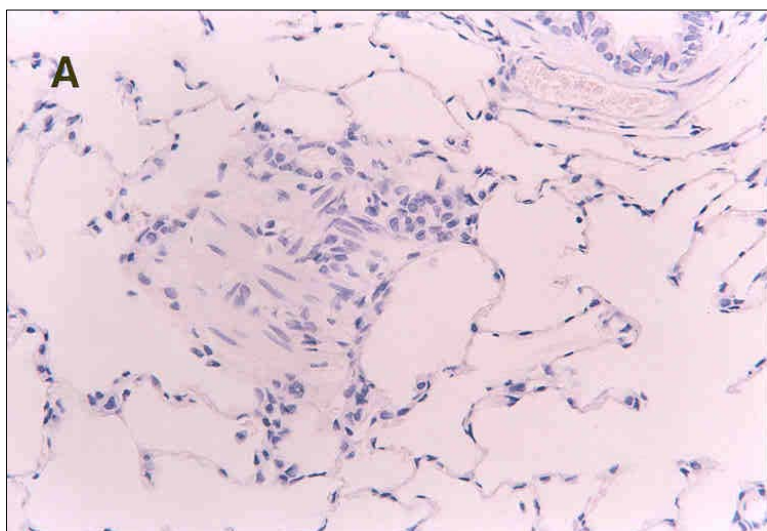
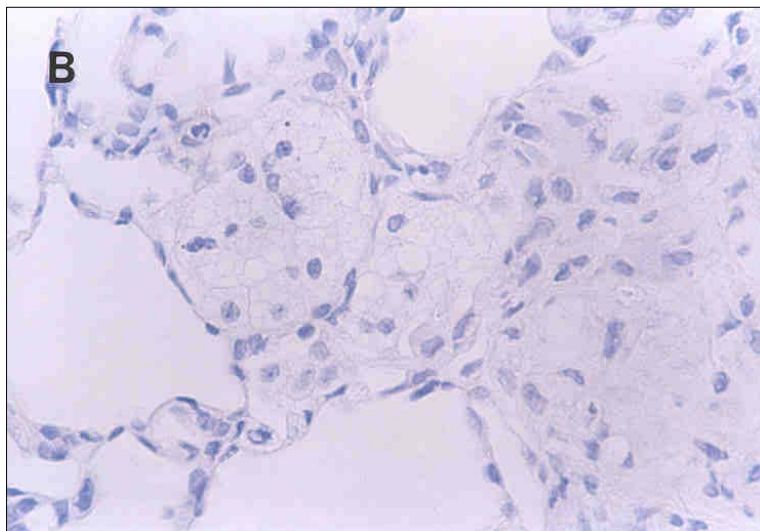


Figure 11. Calidria RG 44 주입 90일 후의 폐조직.

A: 100x, B: 200x





5. 석면대체물질의 폐 내 Biopersistence

석면 대체물질을 기도 주입 후 3일, 30일, 90일, 180일 경과 후 실험동물의 폐를 적출하여 저온회화 처리 후 전자현미경 시료를 작성하여 폐내에서의 Biopersistence를 조사하기 위해 섬유직경과 길이의 변화를 특정하였다. 주입 후 섬유의 직경과 길이의 변화는 아래의 Table 3과 같다.

Table 3. Measurement of fiber diameter and length at 90 days after instillation.

	3 days		30 days		90 days		180 days	
	L	D	L	D	L	D	L	D
Chrysotile	4.6±3.1	0.01±0.01	3.5±3.4	0.02±0.01	5.6±3.4	0.02±0.01	4.6±3.6	0.01±0.0**
TiO ₂	2.3±1.3	0.07±0.07	2.0±1.0	0.03±0.03**	-	-	2.0±0.9	0.04±0.03**
TAFMAG	4.8±4.2	0.05±0.02	3.9±4.3	0.02±0.01**	4.0±3.2	0.02±0.01**	4.2±3.0	0.01±0.0**
Calidria	4.9±2.9	0.02±0.01	4.2±2.4	0.02±0.01	3.8±2.3	0.02±0.01	5.2±2.5	0.01±0.0**
RG-144								
Calidria	4.3±2.1	0.02±0.02	4.6±2.8	0.01±0.01**	4.0±2.1	0.02±0.01**	4.4±1.9	0.01±0.0**
RG-444								

** indicates $p < 0.01$

모든 fiber (Chrysotile, TiO₂, TAFMAG, Calidria)에서 기도 투여 후 180일 동안 fiber의 길이의 변화를 관찰할 수 없었으나 TiO₂, TAFMAG, Calidria RG-444 fiber의 직경은 통계적으로 유의성 ($p < 0.01$) 있는 감소를 보여 주었다.

제 4 장 고찰

석면의 엄격한 규제에 의해 최근 국내에는 석면대체물질이 유통이 증가하고 있는 실정이다. 석면대체물질 중에서도 석면과 유사한 성분을 가진 물질들의 수입시 그 성분 분석 후 제조 허가물질 대상여부를 검토하여 사용할 수 있다. TEM-EDX 장비로는 법에 요구한 중량 성분비를 분석하기는 사실상 힘들며 석면의 중량비를 검증하기 위해서는 표준물질에 비교하여 XRF로 분석하는 방법이 있는데 이 방법도 현실적으로 석면혼합물인 경우 분석이 혼합물의 표준물질과 석면의 표준물질을 혼합하여 분석해야 하므로 상당한 어려움이 있다. 개정된 산업안전보건법에서는 석면을 함유한 물질 (ACM, asbestos containing material)에 관하여 허가물질로 규제하여 향후 석면을 함유한 건축물이나 물건들의 분해 해체 시 허가를 득 하여 일정한 자격과 시설을 갖춘 자가 석면을 함유한 물질을 취급하도록 하고 있으나 허가대상이 되는 석면을 함유한 물질의 중량비를 명시하여야 할 것이다.

석면의 중량비 여부와 상관없이 국내에 도입된 석면 대체물질들 중 석면과 유사한 구조와 성상을 가진 물질들은 석면으로 규제할 것인지 석면이 아닌 물질로 규제할 것인지는 향후 검토되어야 할 과제이다.

석면대체물질들의 독성은 전혀 알려져 있지 않아 흡입폭로 시험을 통한 장기간의 독성시험이 필요하나 이를 위해서는 상당한 비용이 소요되어 EU에서는 석면 대체물질의 biopersitence에 따라 규제하자고 제안하고 있다. 이는 석면과 같은 물질들은 다른 MMMF에 비해 biopersitence하며 biopersistence가 높은 물질들이 높은 독성을 보여주며, 폐에서의 clearance도 잘 되지 않는 것으로 알려져 있다. 이들의 독성시험방법으로는 흡입폭로시험과 주입시험이 권고되고 있는데, 주입시험은 방법이 간단하고 안전하여 상당한 폭로장비와 안전장치가 필요한 흡입시험에 비해 간편한 방법으로 알려져 있다. 이 보고서에서는 주입시험법을 이용하여 국내에 도입된 석면대체물질의 독성을 살펴보았다.

국내에 도입된 TAFMAG, Calidria 144, Calidria 444는 석면대체물질로

도입된 것으로 알려져 있는데 이들의 성분은 성상이나, 성분비, 전자회절을 통한 분석결과에 의하면 거의 chrysotile과 동일하고 석면섬유도 5 micron 이상의 길이를 가지고 있어 근로자의 폭로시 심각한 건강장애를 유발할 우려가 있는 물질로 밝혀졌다. 이 물질의 생체 주입시험결과는 주입 후 3개월 부터 석면과 동일하거나 심한 폐의 반응을 일으키며 biopersitence도 높은 물질로 판명되었다. 향후 주입 후 1년이 경과한 동물의 폐를 분석하면 정확한 결과가 산출되리라 생각된다.

제 5 장 결론

국내에 도입된 석면대체물질 3종을 TEM-EDX를 이용하여 분석하고 이 물질들의 기도 내 주입법을 이용한 독성시험방법에 의해 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. TAFMAG, Calidria 144, Calidria 444는 백석면 (chrysotile)과 같은 동일한 성분과 성상을 가지고 있었다
2. 기도 내 주입 (Instillation)을 이용한 독성시험법에 의해 TAFMAG, Calidria 144, Calidria 444를 주입후 90일이 경과한 동물의 폐는 석면과 동일하거나 심각한 폐내 반응, alveolar septal thickening, granuloma formation, macrophage mobilization등의 반응을 일으켰다.
3. 기도 주입 후 180일 경과한 동물의 폐에서의 석면 및 대체물질의 길이와 직경의 변화를 조사한 결과, 석면과 대체물질들은 섬유 길이에는 아무런 유의성 있는 변화를 보여주지 않았으나, 석면 및 대체물질들은 통계적으로 유의한 ($p<0.01$) 섬유 직경의 감소를 보여주었다.
4. 3종의 석면대체물질들은 chrysotile과 동일한 성분과 성상 그리고 폐 조직병리와 생체지속성 (biopersistence)를 보여주었다.

향후 석면대체물질 주입 후 6개월과 1년이 경과한 동물의 폐의 조직병리와 석면의 성분분석에 의한 결과로 석면대체물질의 독성이 확실히 밝혀지리라 생각하며, 석면과 동일한 성분을 가진 석면대체물질에 대한 규제가 필요하다고 생각된다.

제 6 장 참고문헌

Bellmann G, Muhle H, Biopersistence of various types on mineral fibers in the rat lung after intratracheal application, *Ann. Occup. Hyg.* 1997; 41 (1) supplement: 298-303.

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.

Green F. H. Y, and Churg A., 1998. Pathology of occupational lung disease, Churg A. & Green F. H. Y. editors, pp. 21-44. Williams & Wilkins, Baltimore.

IPCS, Environmental Health Criteria 77, Man-made mineral fibers, 1988. WHO, Geneva.

Kohyama N. Analytical electron microscopy for occupational health and environmental science, *Journal of Clay Science Society of Japan*, 1987;27:88-103

Kohyama N, Kyono H, Yokoyama K, and Sera Y. Evaluation of low-level asbestos exposure by transbronchial lung biopsy with analytical electron microscopy, *J Electron Microscope*, 1993;42:315-327

Kohyama N and Kurimori S. A Total sample preparation method for the measurement of airborne asbestos and other fibers by optical and electron microscopy, *Industrial Health* 1996;34:185-203.

Lee, S. H., Oct 11, 2001. Yeonhap News.

NIOSH. Manual of analytical methods, method 7400, 7402, 9002, NIOSH 1994

Pratt I, Bernstein DM, Lakhanisky T. Technical report on the reasons put forward by the Federal Republic of Germany for applying national provisions which divert from requirements fo directive 97/69/EC, The 23rd adaptation to technical progress of council directive 76/548/EEC, 1999. The European Commission.

Roberson KT, Thomas TC, Sherman LR. Comparison of asbestos air samples by SEM-EDXA and TEM-EDXA, Annual Report of British Occupational Hygiene 1992;36:265-269

Sakai K, Hisanaga N, Kojima A. and Takeuchi Y. Elemental composition of asbestos fibers recovered from human lung, Annual Report of Nagoya City Public Health Research Institute 1991;37:116-119

Selikoff, I. J., Lee, D. H. K., Asbestos and disease, New York Acad. Press, pp 3. New York.

Schlecht PC and Shulman SA. Phase contrast microscopy asbestos fiber counting performance in the proficiency analytical testing program, American Industrial Hygiene Association Journal 1995;56: 480-489

Steel EB and Small JA. Accuracy of transmission electron microscopy for the analysis of asbestos in ambient environments, American Chemical Society 1984;57:209-213

Verma DK and Clark NE. Relationships between phase contrast microscopy and transmission electron microscopy results of samples from occupational exposure to airborne chrysotile asbestos, American Industrial Hygiene Association Journal 1995;56:866-873

Yu IJ, Moon YH, Sakai K, Hisanaga N, Park JD and Takeuchi Y. Asbestos and non-asbestos fiber content in lungs of Korean subjects with no known occupational asbestos exposure history, Environment International 1998;3: 293-300

Yun IG, Kim H. Working environment and health status of asbestos workers in Korea. health risk from exposure to mineral fibers: An international perspective. satellite symposia: Studies on Mineral fibers in Asian countries. New York: Captus University Publication; 1991: 197-202.

강보영, 신용철, 백남원. 위상차 현미경법을 이용한 공기 중 석면농도 분석에서의 정도관리 1991;1(2):221-237

노동부, 2000, 산업안전보건법, 대한민국 노동부.

백남원, 이영환. 석면취급 사업장 근로자의 석면폭로 특성에 관한 연구 1991;1 (2):144-153

유성환, 김현욱. 전자현미경을 이용한 건물 내 비고형 표면소재의 석면 오염 및 기중 석면농도 특성조사, 한국산업위생학회지 1996;6(2):165-175

본 연구보고서에 기재된 내용은 연구책임자의
개인적 견해이며, 우리 공단의 공식견해가 아
님을 알려드립니다.

한국산업안전공단 이사장

입자 및 섬유상 물질의 독성시험법 개발
(연구원 2001 - 84 - 407)

발 행 일 : 2001년 12월 31일

발 행 일 : 산업안전보건연구원 원장 정 호 근

연구책임자 : 산업안전보건연구원 산업화학물질연구센터 수석연구원 유 일 재

발 행 처 : 한국산업안전공단 산업안전보건연구원

주 소 : 인천광역시 부평구 구산동 34-4

전 화 : (032) 5100 - 842

F A X : (032) 5180 - 867
