연구보고서

흡입독성자료를 활용한 희토류물질의 인체무영향 농도 도출 연구

김용순 · 이용훈 · 신서호

산업재해예방
안전보건공단
산업안전보건연구원

요 약 문

1. 연구제목

흡입독성자료를 활용한 희토류물질의 인체무영향 농도 도출 연구

2. 연구 필요성 및 목적

희토류는 산업분야의 발달과 국가 경제적 차원에서 반드시 필요한 주요 핵심원소로서, 도자기 색상, 유리, 라이터와 같은 일상적으로 사용하는 제품에서부터 전자정보, 항공우주, 제련, 핵 산업, 통신 등 첨단과학기술 분야, 주력 첨단 산업인 반도체와 PDP, LCD 등은 물론, 2차 전지나 하이브리드 자동차, 레이저 등 미래 산업분야에서 핵심원소로 필수 불가결한 원소이다. 특히 여러 산업분야에서 활용성이 높은 희토류 나노물질은 연구개발에서 실용화가 빠르게 진행되어 규제수준 및 관리방법의 결정 등 취급근로자의 건강보호를 위한 조치를 취하기 위하여 유해성 평가 등 예방차원의 조치가 필요하다. 17가지의 희토류 금속 원소 중 네오디뮴은 생산량, 가격 등 탁월한 특성 때문에 그 가치가 크지만, 유해성 평가를 위한 독성학적 자료는 제한적이기 때문에 이를 위한 독성자료의 지속적 확보가 요구되고 있다. 따라서 네오디뮴의 실험동물에서의 흡입노출에 의한 체내분포 및 독성영향 평가를 통해 네오디뮴의 인체무영향 농도 도출을 위한 독성자료를 제공하고자 한다.

3. 연구내용 및 방법

수컷 랫드(rat) 및 비부노출 흡입챔버를 사용하여 나노 산화네오디뮴(Aldrich, USA, < 100 ㎚) 에어로졸을 대조군을 포함한 저농도(0.5 ㎎/㎥),

중농도(2.5 ㎎/㎥) 및 고농도(10 ㎎/㎥)의 4개군으로 구성하고 4주 동안(6시간/일, 5회/주) 반복흡입 노출시켰다. 노출기간 중 에어로졸의 농도 및 입자크기는 OPC(Optical Particle Counter)로 측정하였다. Air sampler와 nitrocellulose membrane 필터를 이용하여 포집한 시료를 전자현미경 관찰 및 ICP(Inductively Coupled Plasma)를 이용하여 정량분석 및 입자형태를 확인하였다. 4주 반복흡입노출 후 계획부검을 실시하여 육안 부검소견 관찰, 혈액학 및 혈액생화학적 변화를 측정을 하였다. 폐, 간, 신장, 비장, 뇌를 적출하여 장기중량 및 네오디뮴 분포량을 측정하였고, 기관지폐포세척액 분석을 통해 염증반응 관련 영향을 확인하였다. 산화네오디뮴 반복흡입 노출의 주요 노출장기인 폐에서 산화적 손상 지표와 조직병리학적 관찰을 실시하였다.

4. 연구결과

노출기간 동안 산화 네오디뮴의 입자크기(MMAD, mass median aerodynamic diameter)는 저농도군, 중농도군, 고농도군 각각 평균 0.27 ± 0.22 ㎛, 0.43 ± 0.02 ㎛, 0.67 ± 0.02 ㎛ 이었다. 4주 노출기간 및 회복기간동안 특이할 만한 체중변화 및 일반증상은 관찰되지 않았다. 4주간의 산화 네오디뮴 반복흡입노출 결과 네오디뮴은 저농도, 중농도, 고농도 노출군의 폐에서 8.6 ± 2.6 ㎍/g, 59.0 ± 19.2 ㎍/g, 183.0 ± 25.9 ㎍/g 로 관찰되었고, 4주 회복군의 폐에서는 저농도군, 중농도군, 고농도군 각각 6.7 ± 2.1 ㎍/g, 38.7 ± 12.5 ㎍/g, 120.0 ± 11.3 ㎍/g 으로 관찰 되었다. 기관지폐포세척액을 통하여 폐에서의 국소적인 영향을 확인하기 위해 총세포수, 대식세포, 다형핵백혈구를 측정하였고, 폐손상과 염증영향을 확인하기 위해 LDH(Lactate dehydrogenase), albumin, IL-6(Interleukin-6), TNF-α(Tumor necrosis factor alpha)를 측정하였다. 4주 반복 노출군에서는 관찰된 지표의 수치가 증가하였으나, 4주 회복군에서는 중농도 이하에서는 수치가 감소하는 경향이 관찰되었다. 또한, 폐의 산화적 손상 지표를 확인결과, GSH의 경우 4주

반복 노출군의 중농도 및 고농도에서 대조군에 비해 유의적으로 감소하는 결과가 관찰되었다. 4주 반복 노출군 및 4주 회복군의 계획부검을 실시한 결과, 시험물질과 관련되어 보이는 특이한 소견은 관찰되지 않았지만, 절대 및 상대 장기중량 측정결과 4주 반복 노출군 및 4주 회복군 모든 시험군에서 대조군에 비해 유의적인 증가가 관찰되었다. 폐의 조직병리학적 관찰 결과, 폐포단백증(alveolar proteinosis), 폐포 세포(type Ⅱ)의 과형성 및 비대(hyperplasia/hypertrophy), 폐포 대식세포의 응집(aggregation), 폐포 및 혈관주위세포의 염증(inflammation)이 관찰되었으며, 폐문 림프절(hilar lymph node)에서 대식세포의 응집이 관찰되었다. 4주 반복 노출군에서 관찰된 병리학적 소견은 중농도 이하의 시험군의 4주 회복군에서 병리학적 소견이 점차 감소하는 경향이 관찰되었다. 이상의 결과를 바탕으로 4주 반복 노출군의 무유해용량(NOAEL)은 산출이 되지 않았고, 최소유해용량(LOAEL)은 저농도인 0.5 ㎎/㎥으로 제안된다.

5. 활용 및 기대효과

본 연구는 산화 네오디뮴 흡입 노출을 시험물질의 특성 및 에어로졸 특성에 대한 확인과 분석이 적절히 수행 되어졌으며, 반복흡입 노출에 의한 나노 산화네오디뮴의 조직 내 분포와 폐에서의 국소영향에 대한 독성 정도를 파악하였다. 이를 통해 LOAEL(Lowest-Observed-Adverse-Effect-Level) 자료를 제시하여 작업장에서 산화 네오디뮴을 취급하는 근로자의 건강장해 예방을 위한 작업장 참고농도 산출을 위한 주요 자료로 활용될 수 있다. 또한, 연구결과는 관련 학술지에 투고하여 국내외적으로 활용하고, 희토류 물질의 관리방안 마련을 위한 기초자료로 활용될 수 있다.

6. 중심어

나노, 네오디뮴, 흡입독성, LOAEL, NOAEL

7. 참고문헌 및 연락처

○ 참고문헌

- 임철홍, 김용순, 신서호. 2015. 실험동물 이용한 나노 란탄산화물(La_2O_3)의 흡입독성 연구. 한국산업안전보건공단, 산업안전보건연구원 2015년 연구보고서.
- Ronald J. Palmer, John L. Butenhoff and Jeffrey B. Stevens. Cytotoxicity of the Rare Earth Metals Cerium, Lanthanum, and Neodymium in Vitro: Comparison with Cadmium in a Pulmonary Macrophage Primary Culture System. Environmental Research 43, 142-156(1987)

❑ 연락처

▶ 연구책임자 : 화학물질독성연구실 김용순 연구위원
▶ 연구원 담당자 : 화학물질독성연구실 김용순 연구위원
▶ T : 042-869-8542, F : 042-869-8691 E-mail: somays@kosha.or.kr

차 례

요약문 ····· i

Ⅰ. 서 론 ····· 1
1. 연구배경 ····· 1
2. 연구목적 ····· 5

Ⅱ. 연구방법 ····· 6
1. 시험물질 특성 확인 및 에어로졸 발생 ····· 6
2. 산화 네오디뮴의 흡입독성시험 ····· 8
1) 실험동물 및 사육환경 ····· 8
2) 체중변화 및 일반증상 관찰 ····· 8
3) 주요 장기 및 혈액 내 산화 네오디뮴 분포도 측정 ····· 9
4) 기관지폐포세척액(BAL, Bronchoalveolar lavage fluid) 분석 ····· 9
5) 혈액학 및 혈액생화학 검사 ····· 10
6) 부검 및 조직병리검사 ····· 11
7) 폐의 산화적 손상 지표 측정 ····· 11
3. 통계처리 ····· 12
4. 동물실험윤리위원회 ····· 12

Ⅲ. 연구결과 ····· 13
1. 시험물질 특성 및 에어로졸 발생 ····· 13
1) 시험물질 특성 확인 ····· 13

2) 에어로졸 발생 및 특성 확인 ····· 13
3) 에어로졸 발생 및 노출 ····· 16
2. 산화 네오디뮴의 흡입독성 ····· 17
1) 체중변화 및 일반증상 관찰 ····· 17
2) 주요 장기 및 혈액 내 네오디뮴 정량 분석 ····· 18
3) 기관지폐포세척액(BAL) 분석 ····· 22
4) 혈액학 및 혈액생화학 지표 ····· 28
5) 부검 소견(육안소견) ····· 33
6) 장기중량 측정 ····· 33
7) 조직병리 검사 ····· 36
8) 폐의 산화적 손상 지표 확인 ····· 40

Ⅳ. 고 찰 ····· 42

Ⅴ. 결 론 ····· 47

참고문헌 ····· 48

Abstract ····· 50

표 차 례

<표 1> 희토류의 종류와 용도 ····· 2
<표 2> 산화 네오디뮴 BET 분석 조건 ····· 6
<표 3> 네오디뮴의 ICP-MS 분석 조건 ····· 9
<표 4> BET 측정을 통한 산화 네오디뮴 입자 크기 분석 ····· 13
<표 5> 산화 네오디뮴 수분산액의 입자크기 및 분산성 변화 ····· 14
<표 6> 노출기간 중 산화 네오디뮴 수분산액 특성 ····· 16
<표 7> 노출기간 중 산화 네오디뮴 에어로졸 농도 및 입자 크기 ····· 17
<표 8> 주요장기에서의 네오디뮴 정량 분석 ····· 19
<표 9> 혈청 및 혈액 네오디뮴 정량분석 ····· 21
<표 10> 기관지폐포세척액 염증성 세포 분포 ····· 23
<표 12> 4주 반복 노출군의 혈액학적 변화 ····· 29
<표 13> 4주 회복군의 혈액학적 변화 ····· 30
<표 14> 4주 반복 노출군의 혈액생화학적 변화 ····· 31
<표 15> 4주 회복군의 혈액생화학적 변화 ····· 32
<표 16> 4주 반복 노출군의 장기 중량 변화 ····· 34
<표 17> 4주 회복군의 장기 중량 변화 ····· 35
<표 18> 4주 반복 노출군 폐조직의 조직병리학적 소견 ····· 37
<표 19> 4주 회복군 폐조직의 조직병리학적 소견 ····· 38
<표 20> 폐조직에서 산화적 손상 지표 변화 ····· 41

그 림 차 례

[그림 1] 산화 네오디뮴 에어로졸 발생 모식도 ····· 7
[그림 2] 산화 네오디뮴 분포 전자현미경 상 ····· 15
[그림 3] 노출기간 중 산화 네오디뮴 에어로졸 농도 ····· 17
[그림 4] 노출 및 회복기간 중 체중변화 ····· 18
[그림 5] 노출군 및 회복군에서 주요 장기별 네오디뮴 농도 ····· 20
[그림 6] 노출군 및 회복군에서 혈청 및 혈액 네오디뮴 농도 ····· 21
[그림 7] 노출군 및 회복군에서 기관지폐포세척액의 세포분포 변화 ····· 24
[그림 8] 4주 반복 노출군에서 기관지폐포세척액의 세포분포 형태 ····· 25
[그림 9] 4주 회복군에서 기관지폐포세척액의 세포분포 형태 ····· 26
[그림 10] 4주 반복 노출군의 폐 조직병리 사진 ····· 39
[그림 11] 4주 회복군의 폐 조직병리 사진 ····· 40

Ⅰ. 서 론

1. 연구배경

희토류(rare earth elements, rare earth metals)는 주기율표의 17개 화학원소의 통칭으로, 스칸듐(Sc)과 이트륨(Y), 그리고 란타넘(La) 부터 루테튬(Lu)까지의 란타넘족 15개 원소를 말한다(위키백과). 프로메튬을 제외하고이름과 달리 지구의 지각에 상대적으로 풍부하게 분포한다. 하지만 희토류 원소는 경제성 있는 농축된 형태로는 거의 산출이 되지 않고 있으며, 실제 경제성이 있어 공업용으로 이용되는 광석은 모나자이트(monazite), 바스트나사이트(bastnasite), 제노타임(xenotime), 이온흡착형광 등 몇 종류가 없다. 그럼에도 불구하고 희토류는 독특한 화학, 전기적, 자성적, 발광적 특징과 함께 방사성 차폐에 효과가 있는 특징이 있어 21세기 '전략자원'으로 급부상 하고 있다. 또한, 희토류는 자기적·분광기의 특성을 띠고 있어 철강과 주물 산업, 전화기, 카메라, 개인컴퓨터 같은 전자제품을 비롯한 첨단 기술 산업에서 다양하게 이용되고 있으며, 자동차의 유리 안전장치, 에너지 효율성 3색 램프, 합금, 자석, 전자제품의 세라믹 원료, 산화 연료전지의 성분, 백금 원소의 역할 증대를 위한 자가 촉매, 가스 산업의 광택 파우더 등 희토류의 산업적 측면에서 활용도는 정말 다양하다(김택수 등, 2014).

희토류 원소 중 란탄계열 원소들은 크게 2개 그룹으로 분류될 수 있는데, 원자번호 57~63(La~Eu)까지의 7개 원소가 경(輕)희토류, 원자번호 64~71(Gd~Lu)까지의 8개 원소가 중(重)희토류로 분류된다. 3개 그룹으로 분류할 경우에는 처음 4개 원소(La~Nd)를 경(輕)희토류, 그 다음 4개의 원소(Pr~Gd)를 중(中)희토류, 그리고 나머지 7개 원소(Tb~Lu)를 중(重)희토류로 분류한다.

<표 1> 희토류의 종류와 용도

구분	원소	용도
경(輕)희토류	란타늄(La)	광학유리, 세라믹 콘덴서, 촉매, 발열체, 초전도체
	세륨(Ce)	유리 소색제, 촉매, 광학유리, 영구자석
	프라세오디뮴(Pr)	안료, 영구자석, 촉매
	네오디뮴(Nd)	유리 첨가제, 세라믹 콘덴서, 영구자석, 레이저
중(中)희토률	프로메튬(Pm)	광학유리
	사마륨(Sm)	세라믹 콘덴서, 촉매, 영구자석
	유로퓸(Eu)	적색형광체(컬러TV, 형광등), 원자로 제어제
	가돌리늄(Gd)	원자로 제어제, 광자기 기록, 자기냉동
중(重)희토류	테르븀(Tb)	고연색성 램프, 광자기 기록
	디스프로슘(Dy)	영구자석, 자기냉동
	홀뮴(Ho)	안료, 레이저
	에르븀(Er)	광학유리, 반도체
	툴륨(Tm)	크리스털 제조, 레이저
	이테르븀(Yb)	촉매, 광학유리
	루테늄(Lu)	크리스털 제조, 레이저
비(非)란탄계	스칸듐(Sc)	크리스털 제조, 레이저, 세라믹
	이트륨(Y)	적색형광체(컬러 TV, 형광등), 광학유리, 지르코니아 안정제, 제련, 레이저, 내열합금, 세라믹, 원자로, 구조제

자료: 김부용 등, 2011

희토류의 응용분야별 수요는 배터리 합금에 사용되는 희토류에 대한 수요가 가장 크게 늘어나고 그 다음 영구자석에 대한 수요가 늘어날 것으로 전망하였다. 그리고, 희토류의 글로벌 수요는 해마다 8%씩 증가할 것으로 전망하였고, 희토류 응용분야가 점점 다양화되고, 청정에너지 산업이 급성장하게 되면 희토류 수요가 시간이 지날수록 늘어날 것으로 전망하였고, 희토류 물질 중 특히 네오디뮴, 유로퓸, 테르븀, 디스프로슘, 이트륨의 경우 수요가 매우 증가할 것으로 예상하였다(김부용 등, 2011). 김택수 등(2014)은 국내 희토류 수입량은 2005년 약 400만톤을 수입하였고, 2012년에는 그 수입량이 640만톤으로 증가하였으며, 희토류 특성이 탁월하고, 생산량 및 가격이 적정하여 활용도가 높은 희토류 금속 물질 중 네오디뮴과 세륨을 '첨단산업의 비타민'에 가장 걸 맞는 물질로 이야기 하였다.

네오디뮴은 다른 희토류 금속과의 혼합물에 18% 정도 포함되어 있으며, 공기 중에 빠르게 산화되며, 150℃ 이상에서는 연소하여 네오디뮴 산화물을 생성한다(위키백과). 네오디뮴은 유리, 선글라스 제조 시 첨가물로 사용되며, 고체상태 레이저를 만들 때 활용되기도 한다. 특히 강한 영구자석, 화학촉매, 커페시티, 합금첨가제, 전자재료의 자성재료로 사용된다(김종규 등, 2014). 네오디뮴의 국내 사용량은 약 3톤, 제조 및 수입량은 약 6톤으로 조사되었다(김강윤 등, 2013). 약 3톤 규모의 산화네오디뮴은 MLCC (Multi-Layer Ceramic Capacitor) 촉매에 사용되며, 사용 후 제품에 포함된 네오디뮴은 연간 약 240톤 정도 발생하는 것으로 추정되며, 그 중 환경성 보장제(ECOAS system)를 통해 약 21.9톤이 수집된다(김택수 등, 2014).

한편, 희토류 물질에 대한 독성정보는 많이 부족한 실정이다. 실제 국내 산업안전보건법에 노출기준이 설정되어 있는 희토류는 이트륨(금속 및 화합물) 뿐이며 시간가중평균노출기준(Time Weighted Average, TWA)이 1 ㎎/㎥으로 설정되어 있다(고용노동부, 2013). 이와 같이 대부분의 희토류 물질에 대한 노출기준 등 이 설정되어 있지 않아 네오디뮴을 포함한 다른 희토류 물

질의 유해성평가를 위한 기초자료 확보가 매우 필요하다.

유해성평가를 위한 기존 연구결과를 참조하면, 희토류는 대체적으로 급성독성이 낮은 것으로 확인된다. 노출기준이 설정되어 있는 이트륨 및 세륨, 란타늄, 네오디뮴은 급성흡입독성 결과 LC50 (Lethal Concentration, 반수치사농도) 5000 ㎎/㎥을 초과하는 것으로 확인되었다(임철홍 등, 2015). 하지만, 흡입 노출경로로 반복적인 노출에 의해 폐에 유의한 영향을 주는 것으로 일부 알려져 있지만, 이트륨과 세륨에 대해서만 흡입독성시험결과가 보고되어 있다(ECHA, 2015). 그외 네오디뮴에 관한 기존연구 중 산화 네오디뮴을 Sprgue-Dawley (SD) 랫드(rat) 호흡기 폐포 대식세포를 이용하여 in vitro 세포독성시험 결과 LC50 101 uM 로 세포독성이 관찰되었으며(김종규, 2012), 이런 희토류금속 흄은 폐 조직에 세포독성이 있으며, 섬유화의 잠재적 가능성이 있다고 확인 되었다(Ronald et al., 1987).

네오디뮴은 첨단 산업분야의 발달로 인해 그 활용도가 증가할 것으로 예상되며, 이에 따른 근로자의 네오디뮴 금속화합물 노출이 증가할 것으로 예상된다. 특히 자동차 및 첨단산업 등에서 나노기술을 융합하여 네오디뮴의 나노소재 개발 및 활용도는 점점 더 높아지고 있다.

따라서 본 연구에서 희토류 물질 중 앞으로 계속 활용도가 매우 높을 것으로 예상되며 이로 인해 근로자 건강보호를 위한 유해성평가 실시를 위해 독성자료가 부족한 희토류 물질중 하나인 네오디뮴에 관해 반복흡입독성시험을 수행하고자 하였다. 특히, 나노물질은 일반적인 상태보다 그 크기가 작아지면서 독성이 강해지는 것으로 추정되기 때문에 산화 네오디뮴 나노물질을 이용하여 반복 흡입노출 시험을 수행하였다. 반복 흡입노출에 의한 산화 네오디뮴의 무유해용량 (NOAEL, No-Observed-Adverse-Effect-Level) 확인을 위해 네오디뮴과 같은 경(輕)희토류 중의 하나인 란탄에 대한 기존연구결과를 참조하여 노출 용량을 설정한 후 4주 반복 흡입독성시험을 실시하였다. 그리고, 산화 네오디뮴 반복흡입노출에 의한 폐 손상 회복과 관련된 정보를 확인

하기 위하여 산화 네오디뮴 반복흡입노출 후 4주간 회복기간을 두는 회복군을 통해 노출 이후 일정기간 동안 노출이 없을 경우 폐의 회복성을 확인하고자 하였다.

2. 연구목적

본 연구는 산화 네오디뮴을 4주간 반복흡입노출 시 관찰되는 변화를 확인하고 산화 네오디뮴의 반복흡입노출에 의한 무유해용량(NOAEL) 또는 최소유해용량(LOAEL)을 도출하고자 하였다. 본 연구 수행을 위해 비부노출형 흡입챔버를 이용하여 산화 네오디뮴 수분산 에어로졸의 발생 조건과 입자 특성을 확인하였다. 노출기간 및 회복기간 동안 실험동물 체중변화 및 일반증상을 확인하였으며, 계획 부검 시 혈액학, 혈액생화학 검사 및 주요 장기의 육안소견을 관찰하였다. 노출농도에 따른 산화 네오디뮴의 주요 장기에 축적 및 분포되는 정도를 확인하였고, 산화 네오디뮴에 노출에 의한 폐의 조직병리학적 변화를 관찰 하였다. 또한, 폐 손상의 지표로 많이 활용되고 있는 기관지폐포세척액을 통한 폐의 국소적 변화도 관찰하였다. 이 결과를 바탕으로 산화 네오디뮴의 반복흡입노출에 의한 이상증상과 4주 회복기간동안의 회복성을 확인하고자 하였다.

Ⅱ. 연구방법

1. 시험물질 특성 확인 및 에어로졸 발생

나노 산화 네오디뮴(Nd_2O_3, Noedymium(III) oxide, Nanopowder,< 100 ㎚, Aldrich 6346111, Mo, USA)을 Sigma-Aldrich로 부터 구매하였으며, 시험물질 분석정보(Certificate of Analysis)를 통해 순도 99.9% 를 확인하였다. 시험물질의 입자크기를 확인하기 위해 BET(Brunauer, Emmett and Teller) 분석을 수행하였다. 시료는 50℃ 에서 60~70 × 10^{-3} torr 이하로 압력이 유지될 때까지 12시간 진공 처리하였으며, 분석기기는 BET system(Micromeritics ASAP 2420, USA)를 사용하였다. 분석 조건은 <표 2>와 같다.

<표 2> 산화 네오디뮴 BET 분석 조건

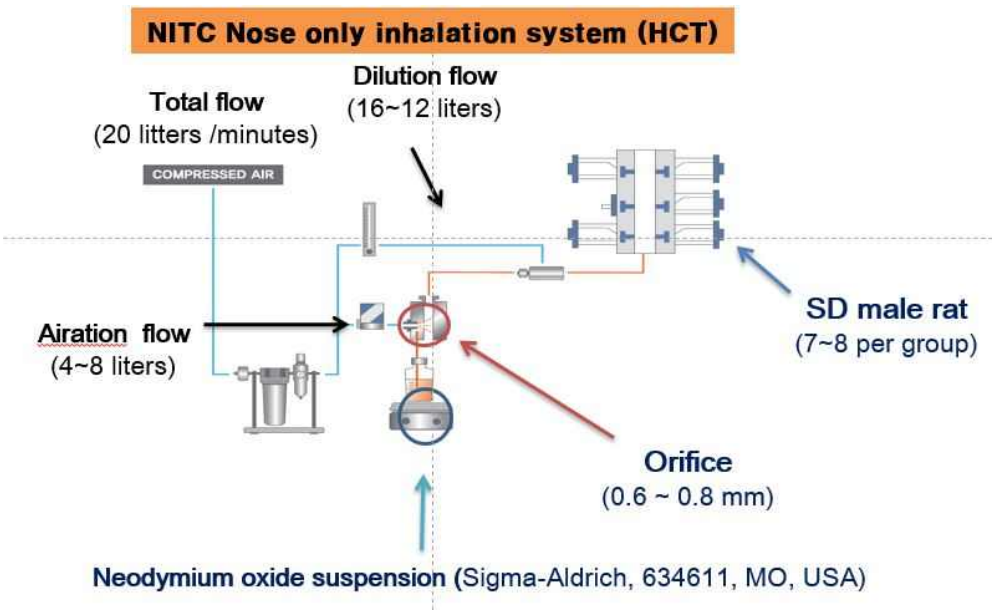
Analysis gas	Equil. time(sec)	Temp.(K)
N_2	10	77

산화 네오디뮴 에어로졸은 나노 네오디뮴 분말을 증류수에 현탁 시킨 후 초음파 처리를 통해 일정하게 분산 시킨 후 비부노출형 흡입챔버시스템(NITC system, HCT, Korea)을 이용하여 발생시켰다(그림 1). 산화 네오디뮴 수용액은 0.09 ~ 1.5% 으로 조제하였고, 이를 얼음에 넣어 열이 발생하는 것을 방지하면서 탐침형초음파기(Ultrasonicator, VC750, USA)를 이용하여 30분간(5초 초음파 처리, 3초 휴지기) 초음파처리를 통해 분산시켰다. 초음파 처리를 실시한 산화 네오디뮴 수분산액의 입자크기는 동적광산란시스템

(Dynamic Llight Scattering, DLS) 입자크기측정기(Zetasizer Nano ZS 90, Malvern, UK)를 사용하여 측정하였다.

시험군은 대조군을 포함하여 저농도군(0.5 ㎎/㎥), 중농도군(2.5 ㎎/㎥), 고농도군(10 ㎎/㎥)으로 구성하였다. 시험물질 노출의 농도는 세륨, 란탄, 네오디뮴 등 구조적으로 유사한 경(輕)희토류 중 기존의 란탄을 이용한 흡입독성 시험자료(임철홍 등, 2015)를 참조하여 노출 농도를 설정하였다.

노출은 산화 네오디뮴 수분산액을 비부노출형 흡입챔버시스템을 이용하여 에어로졸화 시켜 실험동물에 노출 시켰다. 비부노출형 흡입챔버에 산화 네오디뮴 수분산액을 분당 4 ~ 8 ℓ의 공기를 주입하여 에어로졸화 시키고 0.6 ㎜ ~ 0.8 ㎜ 크기의 오리피스(orifice)를 통과시켜 노출 입자크기를 조정하였다. 비부노출형 흡입챔버 내 총 유량은 분당 20 ℓ로(환기회수 15회/시간)하였다. 노출 기간 동안 에어로졸의 농도 및 입자크기 분포는 광학입자계수기(Optical Particle Counter, OPC, GRIMM, Germany)를 이용하여 측정하였다.



[그림 1] 산화 네오디뮴 에어로졸 발생 모식도(임철홍 등, 2015에서 변형)

OPC로 측정된 노출 농도 및 분포는 Nitrocellulose(NC) membrane filter (37mm, Millipore, 0.22 ㎛ GSWP, Ireland)에 포집하여 ICP(7500CE, Agilent technologies, USA)와 전자현미경을 이용하여 확인하였다.

2. 산화 네오디뮴의 흡입독성시험

1) 실험동물 및 사육환경

시험동물은 특정병원체 부재(SPF, specific pathogen free) Sprague-Dawley(SD) 수컷 랫드(rat)를 SLC(Japan) 및 중앙실험동물(주)(Korea)을 통해 구매하여 사용하였다. 실험동물은 폴리설폰 사육상자(W235 x L380 x H175 ㎜)에 사육상자 당 4마리 이하로 실험동물을 사육하였다. 사육환경은 온도 22 ± 3℃, 상대습도 50 ± 20%, 환기회수 13 ~ 18회/시간, 조명주기 12시간(오전 9시 ~ 오후 9시), 조도 150 ~ 300 Lux로 유지하였다. 실험동물은 방사선멸균 고형사료(Labdiet 5053, PMI Nutrition, USA)를 제공하였고 음수는 상수도수를 자외선 살균기 및 미세여과장치로 소독 후 공급하였다. 사육기간 동안 사료 및 음수는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 사료의 조성 및 오염물질에서 시험에 영향을 줄 요인은 없었으며, 음수도 먹는 물 기준에 적합하였다. 시험은 4주 노출시험과 노출 후 4주 회복시험으로 나누어 실시하였고, 시험군은 대조군을 포함한 4개군 (저농도, 중농도 및 고농도)로 구성하였고, 군당 동물은 7 ~ 8마리의 동물을 사용하였다.

2) 체중변화 및 일반증상 관찰

노출기간 및 노출 후 회복기간 동안 모든 실험동물의 일반증상 및 체중변화를 관찰하였다. 체중변화는 주 1회 측정하였다.

3) 주요 장기 및 혈액 내 산화 네오디뮴 분포도 측정

계획 부검 실시 후 주요 장기(폐, 간, 비장, 신장, 뇌)와 혈액 및 혈청 일부를 확보하여 네오디뮴 분석을 통해 조직 및 혈액 내 분포정도를 확인하였다. 네오디뮴 분석은 유도 결합 플라즈마 질량분광법(Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer, ICP-MS 7500CE, Agilent Technologies, USA)을 이용하여 분석하였다. 네오디뮴 분석을 위하여 조직 및 혈액(혈청)을 5~10배 부피(volume)의 69% 질산(Merck, USA)에 충분히 녹인 후 측정하였다. ICP-MS 분석조건은 <표 3>과 같다.

<표 3> 네오디뮴의 ICP-MS 분석 조건

Parameters	Unit	Value
RF power	W	1,600
Sampling depth	Mm	8
Torch-H	Mm	-0.4
Torch-V	Mm	0.4
Carrier gas	L/min	0.7
Makeup gas	L/min	0.5
S/C temp	℃	2
He gas	mL/min	5

4) 기관지폐포세척액(BAL, Bronchoalveolar lavage fluid) 분석

산화 네오디뮴 에어로졸의 4주 반복흡입노출 및 4주 회복기간 후 계획 부검 시 랫드를 Isoflurane(Ilsung Pharm, Korea)으로 마취 및 채혈 이후, 기관지폐포세척액을 수집하였다. 기관지폐포세척액은 폐를 노출 시킨 후 상부기관의 구멍을 통해 미리 제작된 삽관튜브를 통해 채취 하였다. 삽관튜브는 1회용 주

사바늘에 Intramedic™ Polyethylene Tubing(PE-90, ClayAdams, USA)을 결합하여 제작하였다. 기관지폐포세척액의 채취는 총 5회에 걸쳐서 진행하였다. 삽관튜브를 통해 차가운 3 ㎖의 생리식염수를 폐에 주입한 후 이를 회수 하였으며, 이 과정 중 1차로 얻은 기관지폐포세척액은 폐 손상 지표 확인을 위해 별도의 시험관에 보관하였고, 나머지 2 ~ 5차로 얻은 기관지폐포세척액은 세포 회수율을 높이기 위해 하나의 시험관에 모두 보관하였다. 채취된 기관지폐포세척액은 원심분리기를 이용하여 4℃, 1500 rpm으로 10분간 원심 분리하였다. 이후 1차 기관지폐포세척액의 상층액을 혈액생화학분석기(TB-120FR, Toshiba Co, Japan)와 상용으로 판매되는 kit를 이용하여 LDH(lactate dehydrogenase), albumin, TNF-α(tumor necrosis factor alpha), IL(interleukin)-6를 측정하였다. 1차 및 2 ~ 5차로 채취된 기관지폐포세척액에서 얻어진 세포는 한곳으로 모아 세포원심분리기(Cellspin, Hanil, Korea)를 통해 슬라이드에 고르게 도말 및 고정하고 Diff-Quick 용액을 통해 염색한 후 300개 이상의 세포를 계수하여 총세포수, 대식세포, 호중구의 분포 비율을 확인하였다.

5) 혈액학 및 혈액생화학 검사

산화 네오디뮴 에어로졸의 4주 반복흡입노출 및 4주 회복기간 후 계획부검 시 랫드를 Isoflurane(Ilsung Pharm, Korea)으로 마취 후 후대정맥에서 채혈하였다. 항응고제 EDTA(Ethylenediaminetetraacetic acid)가 포함된 CBC bottle(Vacutainer 3 ㎖, BD, USA)에 채혈된 혈액을 자동혈구분석기(Siemens ADVIA 2120i Hematology System, Germany)를 이용하여 WBC(white blood cell), NE(neutrophile), LY(lymphocyte), MO(monocyte), EO(eosinophile), BA(basophile) 등의 혈구를 측정하였다.

혈액생화학검사는 clot activator가 포함된 tube(vacutainer 5㎖, BD,

USA)에 채혈된 혈액을 15 ~ 20분간 상온에서 응고시킨 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리(MF300, Hanil, Korea)하여 얻은 혈청을 혈액생화학분석기(TB-120FR, Toshiba Co, Japan)를 이용하여 TP(total protein), ALB (albumin), BUN(blood urea nitrogen), CRTN(creatinine), T-BIL(total bilirubin), GOT(AST, aspartate aminotransferase), GPT(ALT, alanine aminotransferase), LDH(lactate dehydrogenase), ALP(alkaline phosphatase), GLU(glusose), T-CHO(total cholesterol) 등을 측정하였다.

6) 부검 및 조직병리검사

산화 네오디뮴 에어로졸의 4주 반복흡입노출 및 4주 회복기간 후 계획 부검을 실시하였다. 랫드의 외관, 표피, 전 장기 등을 육안으로 관찰하였다. 폐, 간, 신장, 비장, 뇌는 적출하여 장기중량을 측정하였다. 폐 조직은 10% 중성 포르말린 용액에 24시간 고정 시킨 후, 고정된 조직을 흐르는 물에 1시간 이상 수세하여 포르말린을 제거한 후 자동조직처리기를 이용하여 탈수 및 파라핀 침투 과정을 거친 후 포매를 하였다. 이후 마이크로톰(microtome)을 이용하여 4 ㎛의 절편을 만든 후 슬라이드에 부착시켜 Hematoxylin and eosin(H&E)으로 염색 한 후 100 배 또는 200배로 광학현미경을 이용해 관찰하였다.

7) 폐의 산화적 손상 지표 측정

산화적 손상 지표 확인을 위해 폐 조직을 5배의 50 mM 인산완충용액(pH 7.0)으로 균질화 시킨 후 단백정량을 통해 2 ㎎/g 으로 맞추었다. 이를 Catalase(Cayman catalase kit 707002), GSH(Cayman glutathion assay kit 703002), TBARS(Cayman TBARS assay kit 10009055) kit를 이용하여 측정하였다.

3. 통계처리

시험결과 측정값은 평균값과 표준편차로 표시하였다. 통계는 군간 평균값의 차이에 대한 유의성 검정을 하였으며, 상용통계프로그램인 SPSS 20.0K (USA)를 이용하였다. 사후검정은 Dunnett's t 를 실시하여 통계적 유의성을 검정하였다.

4. 동물실험윤리위원회

본 연구는 동물보호법 시행령 6조 3항 및 시행규칙 제 15조 관련하여 동물실험윤리위원회의 심의 평가를 통하여 동물실험계획, 동물실험의 윤리적·과학적 타당성, 실험동물의 도입·관리·실험 및 이용과 실험이 끝난 후 해당 동물의 처리에 관한 확인 및 평가, 운영자 또는 소속 직원에 대한 교육·훈련 등의 확인 및 평가, 동물실험시설 운용 실태의 확인 및 평가에 관하여 위원회의 심의, 승인 후 수행되었다. 승인된 사용동물 및 마리 수는 다음과 같다.

< 2016년 동물실험윤리위원회 승인: IACUC-1603 (2015.3.25.) >
- Sprague-Dawley (SD) 계통의 특정병원균 부재(SPF) 랫드 수컷 70마리
- 동물이 경험하는 통증 및 스트레스 정도 : E 등급

Ⅲ. 연구결과

1. 시험물질 특성 및 에어로졸 발생

1) 시험물질 특성 확인

산화 네오디뮴의 분석결과 BET(Brunauer, Emmett and Teller) 비표면적은 17.4453 ㎡/g 이었으며, Langmuir 비표면적은 24.5795 ㎡/g 이었다. 산화 네오디뮴의 환산 입자크기는 49.05 ㎚ 로 확인되었다.

<표 4> BET 측정을 통한 산화 네오디뮴 입자 크기 분석

parameter	result
BET surface area (㎡/g)	17.44533
Langmuir surface area (㎡/g)	24.5795
Calculate particle size (㎚)	49.05

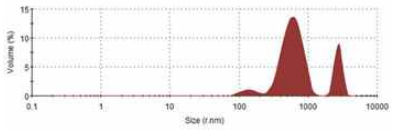
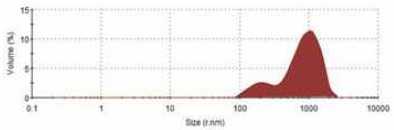
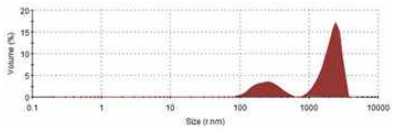
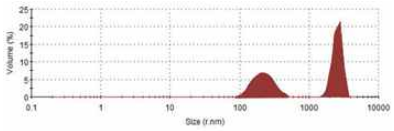
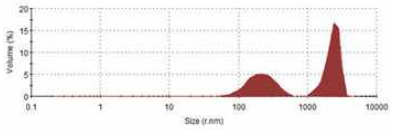
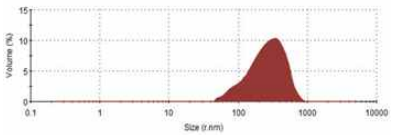
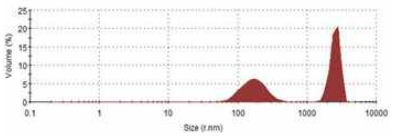
※ average particle diameter in nanometer : 6000/(BET surface area in ㎡/g) × (density in g/㎤)

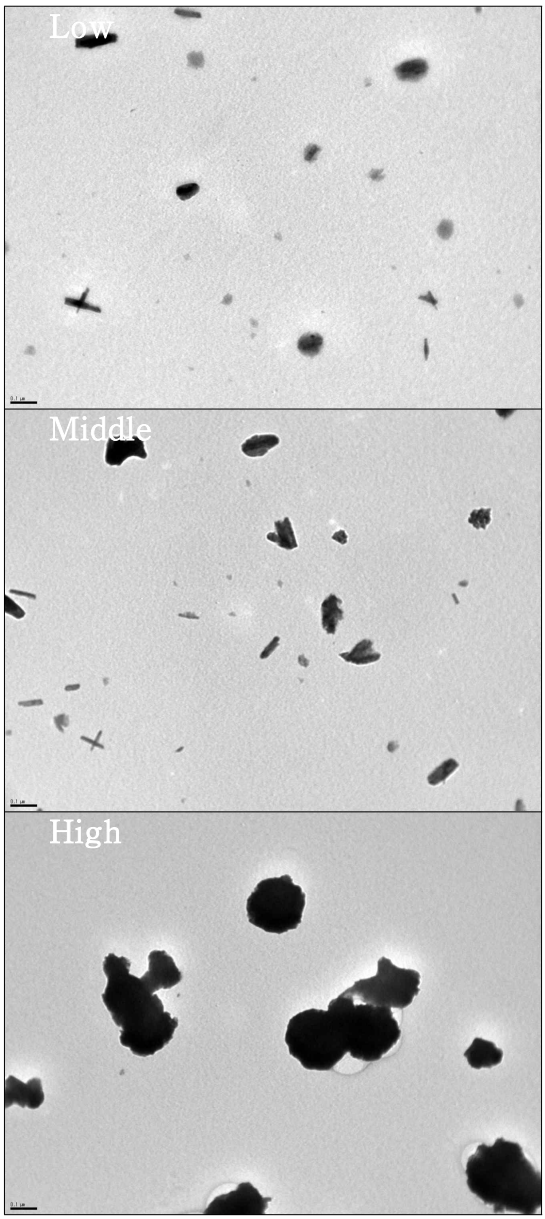
2) 에어로졸 발생 및 특성 확인

산화 네오디뮴 에어로졸의 발생은 산화 네오디뮴 수용액의 농도와 초음파 처리를 통해 수분산액을 통해 발생 시켰다. 먼저, 산화 네오디뮴 분말을 증류수에 0.05%의 수용액을 조제하여 초음파 처리를 통해 분산조건을 확인하였다. 산화 네오디뮴 0.05% 수용액의 입자크기는 688.2 ㎚, PDI(polydispersity index)는 0.357 이었다. 초음파 처리를 통해 에너지를 가하면서 입자크기 및

PDI 측정값이 서서히 작아지는 결과가 관찰되었으나, 100 ㎚ 수준까지는 도달하지 못하였다(표 5). 한편, 전자현미경을 이용한 노출 분포 확인은 <그림 2>와 같다.

<표 5> 산화 네오디뮴 수분산액의 입자크기 및 분산성 변화

Time (min)	Total energy (Jule)	Particle distribution	Particle size (㎚)	PDI
0	0		688.2	0.357
0.5	672		346.7	0.278
2.5	2936		422.0	0.236
5	3634		396.6	0.196
10	7374		354.4	0.184
20	13752		328.9	0.197
30	12909		296.4	0.186



[그림 2] 산화 네오디뮴 분포 전자현미경 상

3) 에어로졸 발생 및 노출

산화 네오디뮴 에어로졸은 4주간 대조군을 포함한 저농도(0.5 ㎎/㎥), 중농도(2.5 ㎎/㎥) 및 고농도(10 ㎎/㎥)의 4개군으로 구성하여 노출시켰다. 노출농도를 일정하게 유지하기 위하여 산화 네오디뮴 수분산액 농도와 에어로졸 발생 유량은 매일 조정하였다.

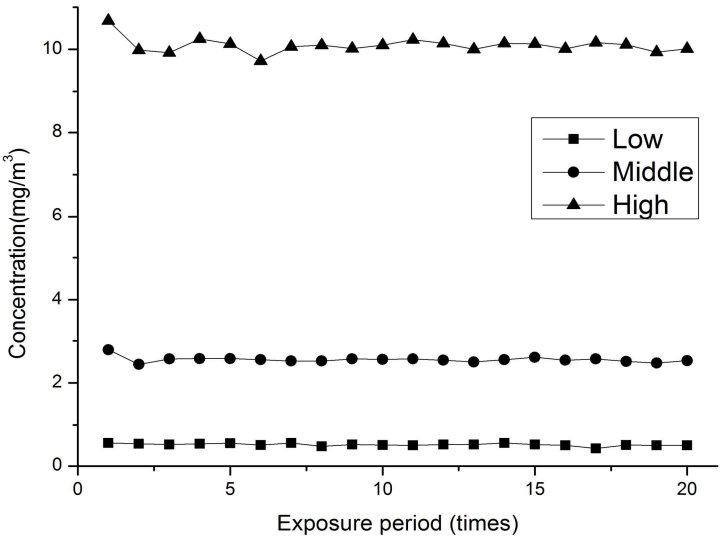
4주간의 노출기간 중 수분산액의 농도는 저농도군, 중농도군, 고농도군 각각 0.10 ± 0.01%, 0.40 ± 0.00%, 1.11 ± 0.13%였으며, 초음파 처리를 통해 가해진 에너지는 각각 251.0 ± 33.0 J/㎖, 253.1 ± 38.8 J/㎖, 256.5 ± 36.5 J/㎖ 이었다. 수분산액의 입자크기는 각각 206.2 ± 31.0 ㎚, 266.5 ± 14.8 ㎚, 273.4 ± 13.2 ㎚, PDI는 각각 0.23 ± 0.05, 0.25 ± 0.05, 0.31 ± 0.04 이었다(표 6).

<표 6> 노출기간 중 산화 네오디뮴 수분산액 특성

	Low	Middle	High
Concentration (%)	0.10 ± 0.01	0.40 ± 0.00	1.11 ± 0.13
Energy (Jule/㎖)	251.0 ± 33.0	253.1 ± 38.8	256.5 ± 36.5
Size (㎚)	206.2 ± 31.0	266.5 ± 14.8	273.4 ± 13.2
PDI	0.23 ± 0.05	0.25 ± 0.05	0.31 ± 0.04

Values are presented as mean ± standard deviation

노출기간 동안 산화 네오디뮴 에어로졸의 농도 및 입자크기는 OPC를 이용하여 측정하였다. 4주 노출기간 동안 에어로졸의 평균농도는 저농도군, 중농도군, 고농도군 각각 0.51 ± 0.03 ㎎/㎥, 2.55 ± 0.07 ㎎/㎥, 10.09 ± 018 ㎎/㎥ 이었다. MMAD(Mass Median Aerodynamic Diameter)는 0.27 ± 0.02 ㎛, 0.43 ± 0.02 ㎛, 0.67 ± 0.02 ㎛ 였다(표 7, 그림 3).



[그림 3] 노출기간 중 산화 네오디뮴 에어로졸 농도

<표 7> 노출기간 중 산화 네오디뮴 에어로졸 농도 및 입자 크기

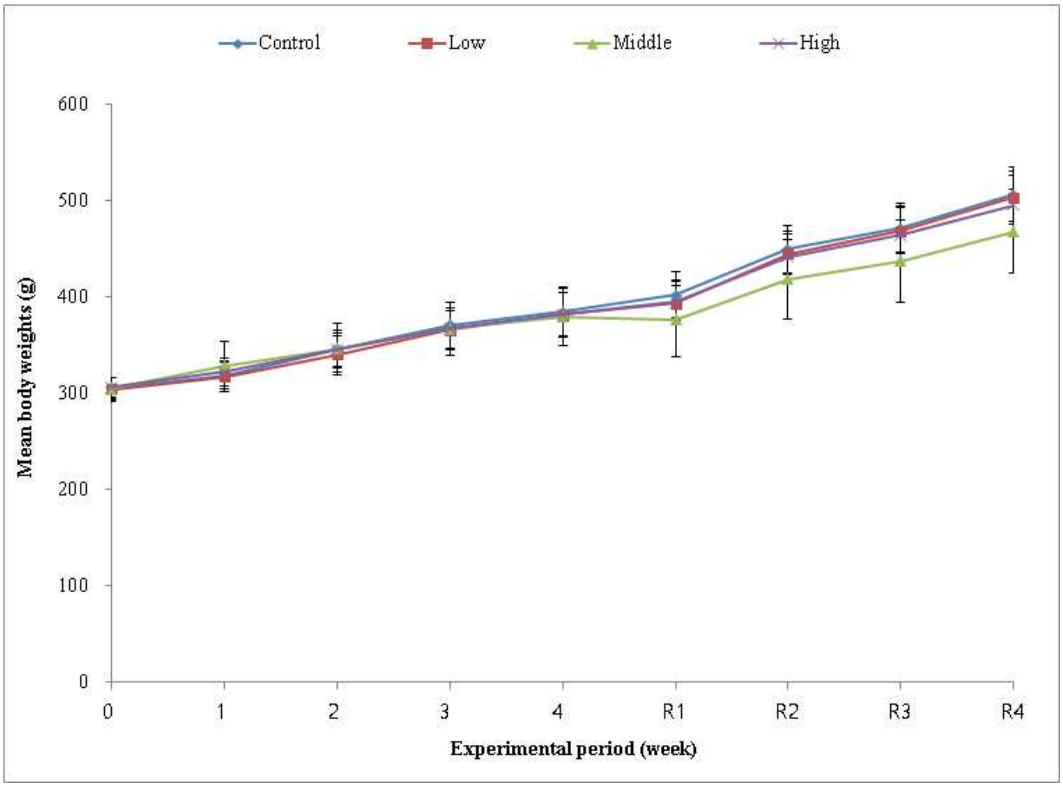
	Low	Middle	High
Concentration (mg/m^3)	0.51 ± 0.03	2.55 ± 0.07	10.09 ± 0.18
MMAD (㎛)	0.27 ± 0.02	0.43 ± 0.02	0.67 ± 0.02
GSD	1.75 ± 0.13	1.56 ± 0.07	1.53 ± 0.02

MMAD, mass median aerodynamic diameter; GSD, geometric standard deviation
Values are presented as mean ± standard deviation

2. 산화 네오디뮴의 흡입독성

1) 체중변화 및 일반증상 관찰

노출 및 회복기간 동안 시험물질(산화 네오디뮴) 노출과 관련된 특이할만한 일반증상은 관찰되지 않았으며(자료 제시하지 않음), 체중측정 결과 대조군에 비해 유의적인 체중변화는 관찰되지 않았다(그림 4).



[그림 4] 노출 및 회복기간 중 체중변화

2) 주요 장기 및 혈액 내 네오디뮴 정량 분석

4주 반복 노출군 및 4주 회복군의 주요 장기 내 네오디뮴 정량 분석 결과는 <표 8> 및 <그림 4>와 같다. 4주 반복 노출군의 폐에서 저농도군, 중농도군, 고농도군 각각 8.6 ± 2.6 ㎍/g, 59.0 ± 19.2 ㎍/g, 183.0 ± 25.9 ㎍/g 으로 관찰되었고, 4주 회복군의 폐에서는 저농도군, 중농도군, 고농도군 각각 6.7 ± 2.1 ㎍/g, 38.7 ± 12.5 ㎍/g, 120.0 ± 11.3 ㎍/g 으로 관찰 되었으며, 대조군에 비해 모든 시험군에서 유의적으로 증가하는 결과가 확인 되었다. 한편 4주 회복군의 경우 회복기간 후 4주 반복 노출군에 비해 저농도군, 중농도군, 고농

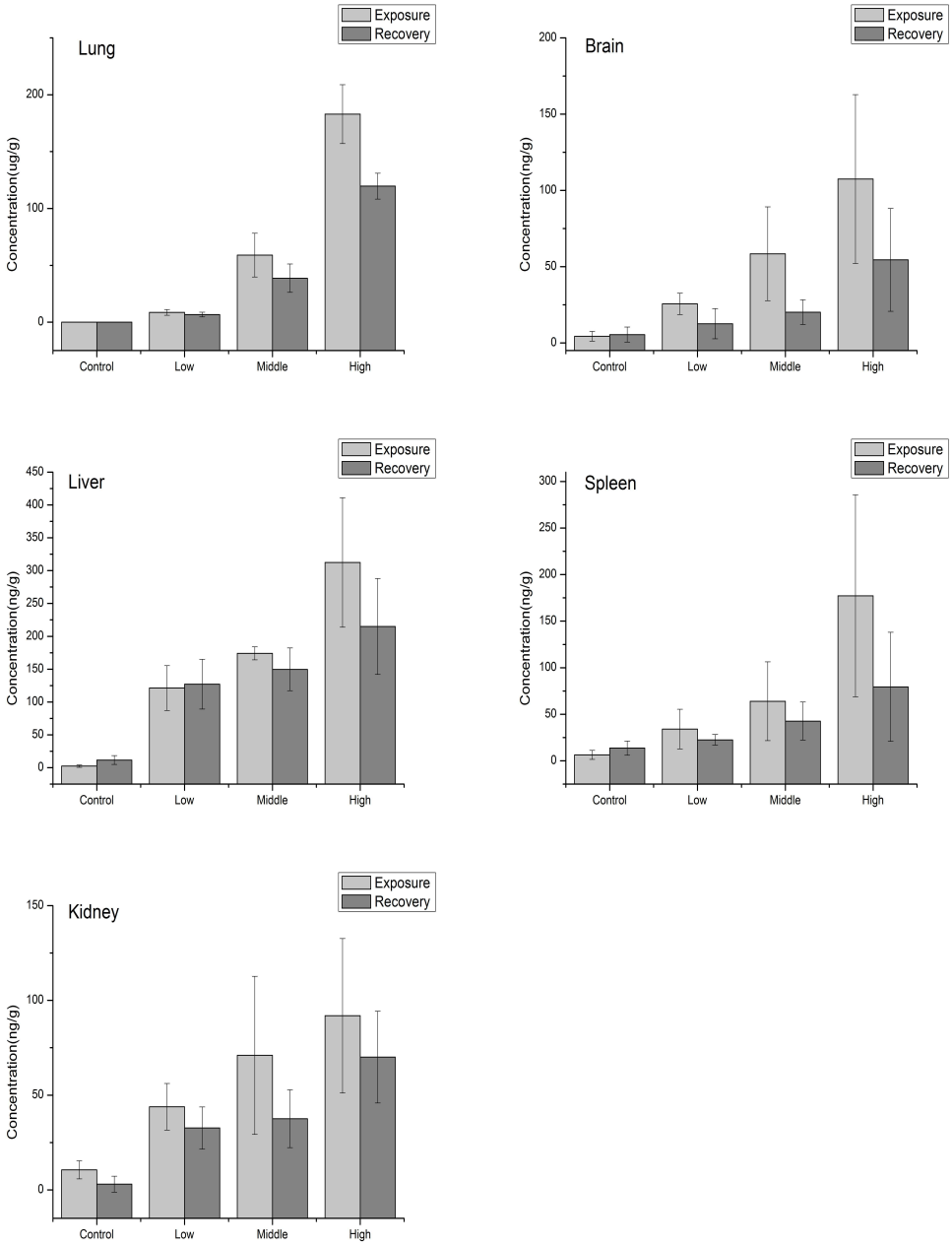
도군 각각 약 22.1%, 34.4%, 34.6% 감소하는 경향이 관찰되었다. 뇌, 간, 신장의 경우 4주 반복 노출군의 모든 시험군에서 대조군에 비해 유의적인 증가가 관찰되었으나, 비장의 경우 고농도군에서만 유의적인 증가가 관찰되었다. 4주 회복군에서는 4주 반복 노출군에 비해 각 농도별로 네오디뮴 분석 결과 수치가 줄어드는 것을 확인할 수 있었다.

혈청 및 혈액의 네오디뮴 정량 분석 결과, 혈청 4주 반복 노출군에서 대조군에 비해 유의적인 증가가 관찰되었으나, 4주 회복군에서는 유의적인 변화는 관찰되지 않았다. 혈액의 경우, 4주 반복 노출군 및 회복군에서 대조군에 비해 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

<표 8> 주요장기에서의 네오디뮴 정량 분석

	Control	Low	Medium	High
4-week exposure				
No. of animals	8	8	8	8
Lung (㎍/g)	0.0 ± 0.0	8.6 ± 2.6**	59.0 ± 19.2**	183.0 ± 25.9**
Brain (ng/g)	4.4 ± 3.2	25.6 ± 7.0*	58.5 ± 30.8*	108.0 ± 55.3**
Liver (ng/g)	2.4 ± 1.9	121.0 ± 34.2**	174.0 ± 9.9**	312.0 ± 98.6**
Spleen (ng/g)	6.4 ± 4.8	34.1 ± 21.3	64.0 ± 42.3	177.0 ± 108.0*
Kidney (ng/g)	10.6 ± 4.8	43.9 ± 12.3**	71.0 ± 41.7*	91.9 ± 40.8**
4-weeks recovery				
No. of animals	8	8	7	8
Lung (㎍/g)	0.0 ± 0.0	6.7 ± 2.1**	38.7 ± 12.5**	120.0 ± 11.3**
Brain (ng/g)	5.5 ± 4.9	12.6 ± 9.9	20.2 ± 8.1*	54.5 ± 33.7**
Liver (ng/g)	11.7 ± 6.8	127.0 ± 37.8**	150.0 ± 32.5**	215.0 ± 72.9**
Spleen (ng/g)	13.7 ± 7.6	22.6 ± 5.7	42.7 ± 20.4	79.5 ± 58.6
Kidney (ng/g)	3.1 ± 4.2	32.7 ± 11.1**	37.6 ± 15.3**	70.1 ± 24.2**

Values are presented as mean ± standard deviation
*, P<0.05 versus control; **, P<0.01 versus control



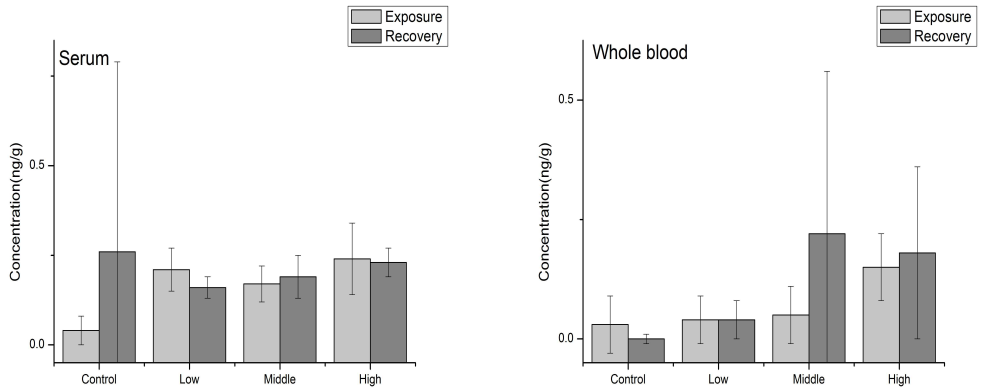
[그림 5] 노출군 및 회복군에서 주요 장기별 네오디뮴 농도

<표 9> 혈청 및 혈액 네오디뮴 정량분석

	Control	Low	Medium	High
4-week exposure				
No. of animals	8	8	8	8
Serum (ng/g)	0.04 ± 0.04	0.21 ± 0.06**	0.17 ± 0.05**	0.24 ± 0.10**
Whole blood (ng/g)	0.03 ± 0.06	0.04 ± 0.05	0.05 ± 0.06	0.15 ± 0.07*
4-weeks recovery				
No. of animals	8	8	7	8
Serum (ng/g)	0.26 ± 0.53	0.16 ± 0.03	0.19 ± 0.06	0.23 ± 0.04
Whole blood (ng/g)	0.00 ± 0.01	0.04 ± 0.04	0.22 ± 0.34	0.18 ± 0.18

Values are presented as mean ± standard deviation

*, P<0.05 versus control; **, P<0.01 versus control



[그림 6] 노출군 및 회복군에서 혈청 및 혈액 네오디뮴 농도

3) 기관지폐포세척액(BAL) 분석

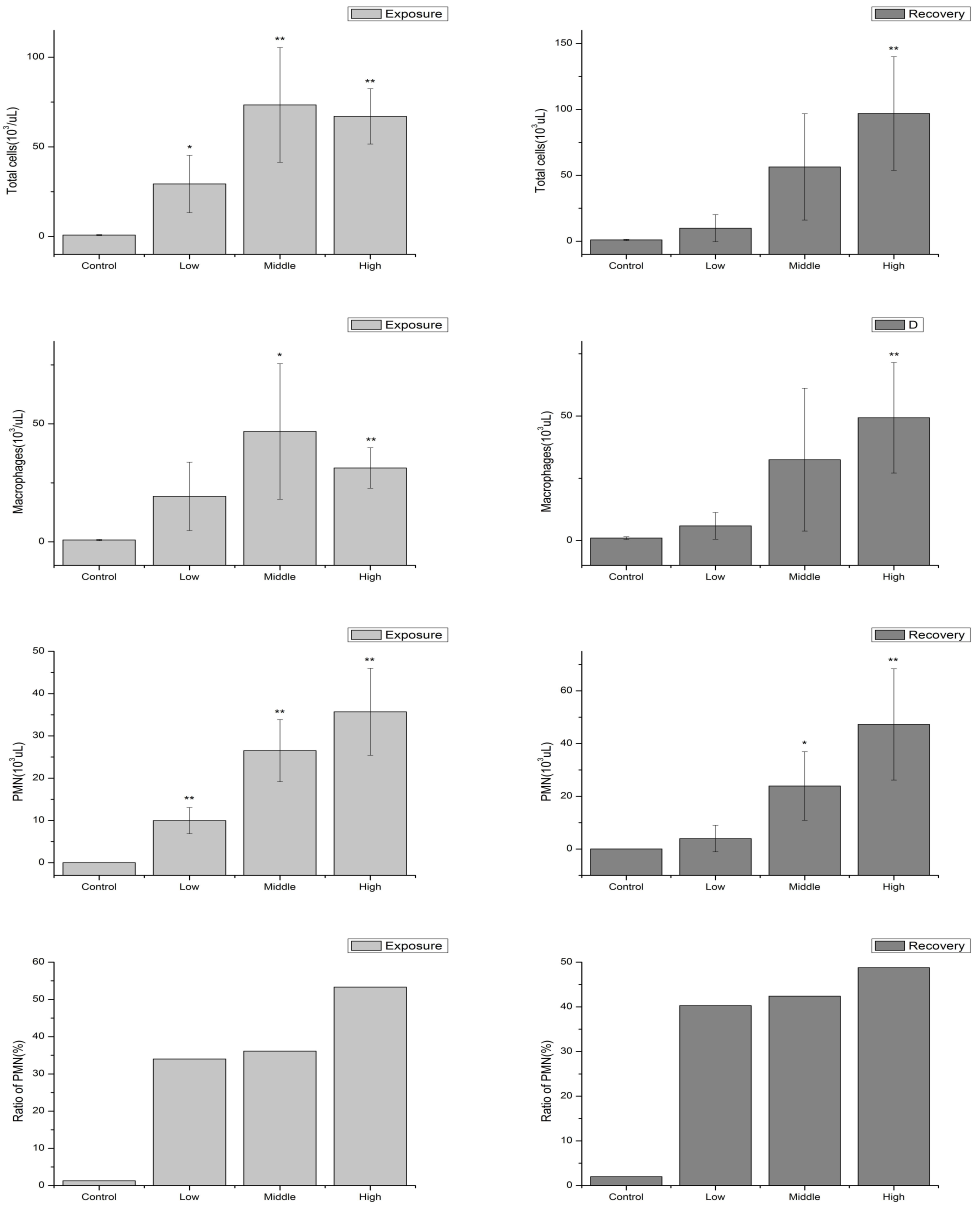
4주 반복 노출군의 총 세포(total cells) 수는 대조군, 저농도, 중농도 및 고농도에서 각각 0.78 ± 0.31 $10^3/\mu\ell$, 29.3 ± 16.0 $10^3/\mu\ell$, 73.4 ± 32.0 $10^3/\mu\ell$, 67.0 ± 15.4 $10^3/\mu\ell$ 개로 관찰되었으며, 모든 시험군에서 대조군에 비해 유의적인 증가가 관찰되었다. 4주 회복군의 총 세포 수는 대조군, 저농도, 중농도 및 고농도에서 각각 1.01 ± 0.56 $10^3/\mu\ell$, 9.91 ± 10.3 $10^3/\mu\ell$, 56.4 ± 40.3 $10^3/\mu\ell$, 96.9 ± 43.1 $10^3/\mu\ell$ 개로 관찰되었으며, 고농군에서만 대조군에 비해 유의적인 증가가 관찰되었다. 4주 반복 노출군의 대식세포(macrophages)는 중농도 및 고농도에서 대조군에 비해 유의한 증가가 관찰되었고, 다형핵백혈구(polymorphnuclear leukocyte, PMN)는 모든 시험군에서 대조군에 비해 유의한 증가가 관찰되었다. 다형핵백혈구의 비율은 저농도, 중농도 및 고농도 각각 약 34%, 36%, 53%로 증가하였다. 4주 회복군의 대식세포는 고농도에서 대조군에 비해 유의한 증가가 관찰되었고, 다형핵백혈구는 중농도 및 고농도에서 대조군에 비해 유의한 증가가 관찰되었다. 다형핵백혈구의 비율은 중농도 및 고농도 각각 약 42%, 49% 로 증가하였다(표 10, 그림 7).

세포분포의 형태는 <그림 8> 및 <그림 9>와 같다. 저농도, 중농도 및 고농도에서 포말(foamy, 화살표 모양 표시), 일그러진 형태(distorted, 화살촉모양) 및 협착(collapsed, 별표 표시)된 형태가 관찰되었다.

<표 10> 기관지폐포세척액 염증성 세포 분포

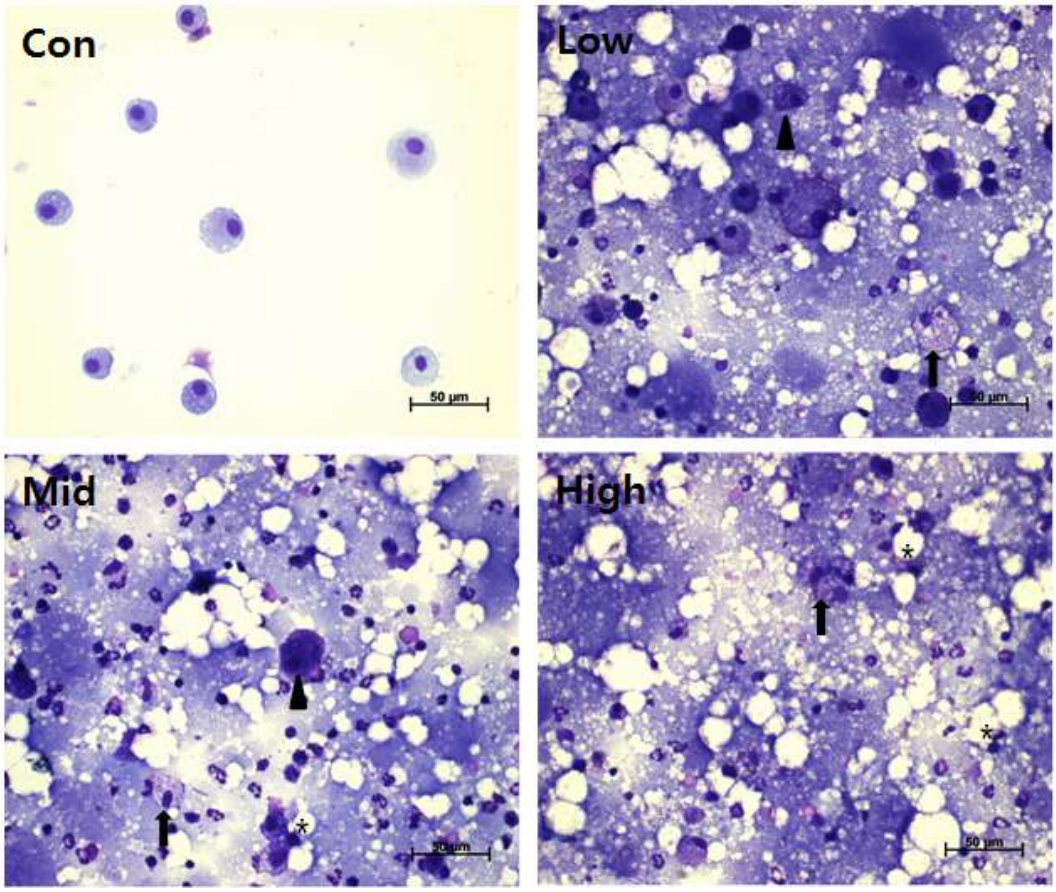
	Control	Low	Medium	High
4-week exposure				unit :$10^3/\mu\ell$
No. of animals	8	8	8	8
Total cells	0.78 ± 0.31	29.3 ± 16.0*	73.4 ± 32.0**	67.0 ± 15.4**
Macrophages	0.77 ± 0.30	19.3 ± 14.5	46.8 ± 28.7*	31.3 ± 8.57**
PMNs	0.01 ± 0.03	9.96 ± 3.10**	26.5 ± 7.35**	35.7 ± 10.3**
4-weeks recovery				unit :$10^3/\mu\ell$
No. of animals	8	8	7	8
Total cells	1.01 ± 0.56	9.91 ± 10.3	56.4 ± 40.3	96.9 ± 43.1**
Macrophages	0.98 ± 0.55	5.91 ± 5.39	32.5 ± 28.7	49.3 ± 22.2**
PMNs	0.02 ± 0.02	3.99 ± 5.02	23.9 ± 13.0*	47.3 ± 21.1**

Values are presented as mean ± standard deviation
*, P<0.05 versus control; **, P<0.01 versus control
PMN, polymorphonuclear leukocyte

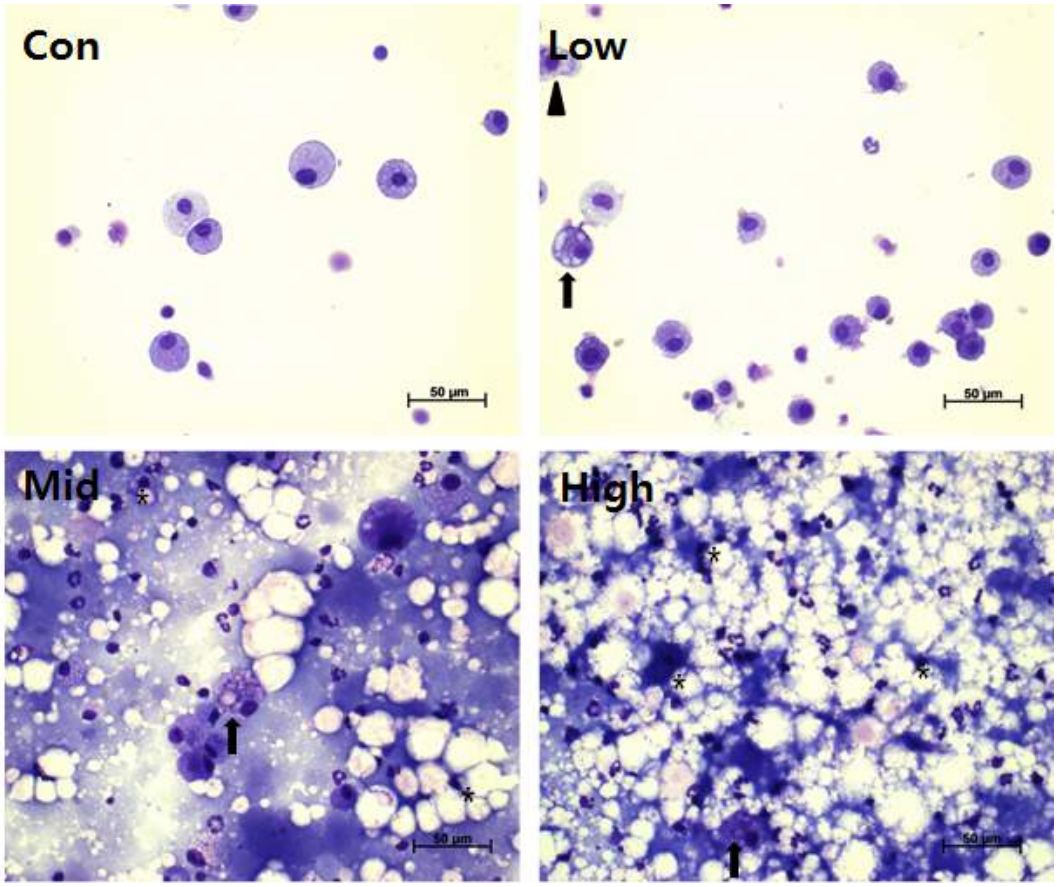


[그림 7] 노출군 및 회복군에서 기관지폐포세척액의 세포분포 변화

Error bars indicate standard deviation
*, P<0.05 versus control; **, P<0.01 versus control



[그림 8] 4주 반복 노출군에서 기관지폐포세척액의 세포분포 형태(400배 관찰)



[그림 9] 4주 회복군에서 기관지폐포세척액의 세포분포 형태(400배 관찰)

기관지폐포세척액에서 세포 손상정도를 확인하기 위하여 LDH(Lactate dehydrogenase), albumin을 측정하였다. 또한, 염증반응 대한 영향을 확인하기 위하여 염증에 영향을 미치는 세포전달물질(사이토카인, cytokine)으로 IL-6(Interleukin-6)와 TNF-α(Tumor necrosis factor alpha) 변화를 확인하였다. LDH는 4주 반복 노출군의 모든 시험군에서 대조군에 비해 유의적인 증가를 관찰하였고, 저농도, 중농도 및 고농도 각각 대조군에 비해 약 9배, 12배, 12배의 증가가 관찰되었다. 4주 회복군에서도 모든 시험군에서 대조군에

비해 유의한 증가가 관찰되었으며, 저농도, 중농도 및 고농도 각각 대조군에 비해 약 4배, 25배, 45배의 증가가 관찰되었다.

Albumin의 경우, 4주 반복 노출군의 모든 시험군에서 대조군에 비해 유의한 증가가 관찰되었으며, 4주 회복군에서는 중농도 및 고농도에서 대조군에 비해 유의한 증가가 관찰되었다. 염증반응과 관련된 IL-6(Interleukin-6)는 4주 반복 노출군의 중농도 및 고농도에서 대조군에 비해 유의한 증가가 관찰되었으며, 4주 회복군에서는 고농도만 유의적인 변화가 관찰되었다. 4주 회복군은 노출군에 비해 수치가 감소되는 경향이 관찰되었다. TNF-α(Tumor necrosis factor alpha)는 4주 반복 노출군의 모든 시험군에서 대조군에 비해 유의한 증가가 관찰되었으며, 4주 회복군에서는 중농도 및 고농도에서 유의한 증가가 관찰되었다. 하지만, 4주 회복군에서 4주 반복 노출군에 비해 수치가 감소하는 경향은 관찰되지 않았다.

<표 11> 기관지폐포세척액의 세포손상성 지표 변화

	Control	Low	Medium	High
4-week exposure				
No. of animals				
LDH (IU/L)	89.9 ± 33.4	771 ± 195**	1117 ± 179**	1080 ± 345**
Albumin (mg/dℓ)	0.00 ± 0.00	18.3 ± 7.18**	33.9 ± 13.3**	36.9 ± 19.1**
IL-6 (pg/mℓ)	71.6 ± 9.6	82.9 ± 14.9	102.0 ± 8.9**	114.0 ± 22.2**
TNF-α (pg/mℓ)	3.64 ± 0.41	5.94 ± 1.09*	7.89 ± 2.49*	8.46 ± 3.46*
4-weeks recovery				
No. of animals				
LDH (IU/L)	27.1 ± 6.95	109 ± 57.9*	669 ± 113**	1216 ± 264**
Albumin (mg/dℓ)	1.13 ± 1.46	4.38 ± 4.66	30.2 ± 7.08**	63.9 ± 18.4**
IL-6 (pg/mℓ)	70.0 ± 7.9	72.8 ± 10.3	77.9 ± 9.9	100.0 ± 16.5*
TNF-α (pg/mℓ)	2.63 ± 0.69	3.52 ± 0.91	7.59 ± 2.10**	9.34 ± 3.47**

Values are presented as mean ± standard deviation. *, P<0.05 versus control; **, P<0.01 versus control. LDH, lactate dehydrogenase; TNF-α, tumor necrosis factor alpha; IL-6, interleukin 6

4) 혈액학 및 혈액생화학 지표

4주 반복 노출시험군 및 4주 회복군의 혈액학 및 혈액생화학 측정 결과 대조군에 비해 유의한 결과는 관찰되지 않았다(표 12 ~ 15).

<표 12> 4주 반복 노출군의 혈액학적 변화

	Control	Low	Medium	High
No. of animals	8	8	8	8
RBC (10^6/μl)	8.40 ± 0.41	8.69 ± 0.30	8.82 ± 0.60	8.58 ± 0.51
Hemoglobin (g/dl)	15.1 ± 0.71	15.7 ± 0.48	15.8 ± 0.65	15.4 ± 0.63
Hematocrit (%)	42.3 ± 1.63	43.8 ± 1.49	44.2 ± 1.97	42.7 ± 1.80
MCV (fL)	50.4 ± 1.04	50.4 ± 1.63	50.2 ± 1.50	49.8 ± 1.37
MCH (pg)	18.0 ± 0.55	18.1 ± 0.60	17.9 ± 0.56	17.9 ± 0.70
MCHC (g/dl)	35.7 ± 0.51	35.8 ± 0.25	35.6 ± 0.35	36.5 ± 0.96
RDW (%)	12.4 ± 0.76	12.1 ± 0.46	11.9 ± 0.68	12.9 ± 2.04
Platelet (10^3/μl)	925 ± 121	987 ± 113	772 ± 157	984 ± 51.4
MPV (fL)	9.16 ± 0.66	8.91 ± 0.49	8.85 ± 0.74	9.76 ± 1.68
WBC (10^3/μl)	3.90 ± 1.20	4.82 ± 0.85	4.49 ± 2.31	4.08 ± 1.65
Neutrophils (10^3/μl)	0.79 ± 0.29	0.99 ± 0.25	1.08 ± 0.61	0.78 ± 0.21
Lymphocytes (10^3/μl)	2.97 ± 1.01	3.65 ± 0.70	3.22 ± 1.68	3.12 ± 1.42
Monocytes (10^3/μl)	0.06 ± 0.03	0.08 ± 0.03	0.10 ± 0.07	0.09 ± 0.04
Eosinophils (10^3/μl)	0.05 ± 0.04	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.05 ± 0.03
Basophils (10^3/μl)	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01

RBC, red blood cell count; MCV, mean corpuscular volume; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; RDW, red cell distribution width; MPV, mean platelet volume; WBC, white blood cell

Values are presented as mean ± standard deviation

<표 13> 4주 회복군의 혈액학적 변화

	Control	Low	Medium	High
No. of animals	8	8	7	8
RBC ($10^6/\mu\ell$)	8.63 ± 0.32	8.71 ± 0.27	9.20 ± 0.46	9.09 ± 0.37
Hemoglobin (g/dℓ)	15.6 ± 0.43	15.7 ± 0.86	15.9 ± 0.53	16.0 ± 0.53
Hematocrit (%)	44.9 ± 1.49	45.0 ± 2.08	46.9 ± 2.19	46.4 ± 1.76
MCV (fL)	52.0 ± 0.83	51.6 ± 1.73	51.0 ± 1.25	51.1 ± 0.69
MCH (pg)	18.1 ± 0.55	18.0 ± 0.70	17.3 ± 0.69	17.6 ± 0.39
MCHC (g/dℓ)	34.7 ± 0.78	34.8 ± 0.61	33.9 ± 0.99	34.5 ± 0.59
RDW (%)	13.9 ± 0.56	14.1 ± 0.27	13.4 ± 0.39	14.6 ± 2.26
Platelet ($10^3/\mu\ell$)	983 ± 51.0	971 ± 61.2	944 ± 111	993 ± 94.2
MPV (fL)	7.79 ± 0.34	7.68 ± 0.33	7.53 ± 0.27	7.83 ± 0.67
WBC ($10^3/\mu\ell$)	5.23 ± 0.75	5.37 ± 1.14	5.43 ± 0.58	5.76 ± 1.25
Neutrophils ($10^3/\mu\ell$)	1.01 ± 0.14	1.23 ± 0.44	1.34 ± 0.26	1.28 ± 0.23
Lymphocytes ($10^3/\mu\ell$)	3.94 ± 0.70	3.90 ± 0.93	3.84 ± 0.35	4.23 ± 1.13
Monocytes ($10^3/\mu\ell$)	0.13 ± 0.02	0.11 ± 0.06	0.12 ± 0.04	0.11 ± 0.03
Eosinophils ($10^3/\mu\ell$)	0.08 ± 0.02	0.07 ± 0.04	0.07 ± 0.02	0.07 ± 0.03
Basophils ($10^3/\mu\ell$)	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.01

RBC, red blood cell count; MCV, mean corpuscular volume; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; RDW, red cell distribution width; MPV, mean platelet volume; and WBC, white blood cell

Values are presented as mean ± standard deviation

<표 14> 4주 반복 노출군의 혈액생화학적 변화

	Control	Low	Medium	High
No. of animals	8	8	8	8
AST (IU/L)	94.4 ± 20.1	92.2 ± 18.8	105 ± 31.5	110 ± 22.0
ALT (IU/L)	56.1 ± 7.30	59.7 ± 11.9	58.0 ± 11.0	54.2 ± 8.45
ALP (IU/L)	598 ± 51.5	677 ± 101	667 ± 100	607 ± 138
GGT (IU/L)	0.69 ± 0.60	0.38 ± 0.24	0.28 ± 0.32	0.45 ± 0.62
CPK (IU/L)	436 ± 225	290 ± 115	334 ± 209	414 ± 131
LDH (IU/L)	1331 ± 622	842 ± 309	1030 ± 724	1404 ± 385
TBil (mg/dℓ)	0.17 ± 0.02	0.18 ± 0.03	0.21 ± 0.04	0.19 ± 0.03
Glucose (mg/dℓ)	124 ± 11.1	127 ± 12.6	120 ± 15.6	111 ± 8.52
TCho (mg/dℓ)	59.3 ± 10.2	58.5 ± 9.14	54.8 ± 7.43	54.4 ± 12.0
Triglyceride (mg/dℓ)	38.7 ± 11.6	37.6 ± 13.7	34.5 ± 11.1	26.2 ± 6.10
TP (g/dℓ)	6.23 ± 0.13	6.34 ± 0.12	6.35 ± 0.16	6.30 ± 0.23
Albumin (g/dℓ)	4.21 ± 0.08	4.29 ± 0.10	4.28 ± 0.10	4.23 ± 0.15
BUN (mg/dℓ)	16.6 ± 1.74	18.5 ± 1.18	17.7 ± 1.98	14.8 ± 1.00
Creatinine (mg/dℓ)	0.42 ± 0.02	0.42 ± 0.02	0.44 ± 0.02	0.43 ± 0.02
IP (mg/dℓ)	7.43 ± 0.49	7.70 ± 0.37	7.73 ± 0.35	7.84 ± 0.44
Ca (mg/dℓ)	10.2 ± 0.21	10.1 ± 0.16	10.1 ± 0.21	10.1 ± 0.21

AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; GGT, gamma glutamyl transferase; CPK, creatine phosphokinase; LDH, lactate dehydrogenase; TBil, total bilirubin; TCho, total cholesterol; TP, total protein; BUN, blood urea nitrogen; IP, inorganic phosphorus; and Ca, calcium.

Values are presented as mean ± standard deviation

<표 15> 4주 회복군의 혈액생화학적 변화

	Control	Low	Medium	High
No. of animals	8	8	7	8
AST (IU/L)	85.5 ± 9.79	83.8 ± 11.0	84.6 ± 11.5	92.3 ± 19.8
ALT (IU/L)	54.1 ± 6.10	62.4 ± 15.0	63.3 ± 10.3	59.4 ± 9.73
ALP (IU/L)	618 ± 140	617 ± 176	649 ± 189	604 ± 101
GGT (IU/L)	0.99 ± 0.71	1.06 ± 0.49	1.21 ± 0.63	0.95 ± 0.45
CPK (IU/L)	262 ± 134	274 ± 196	217 ± 135	203 ± 124
LDH (IU/L)	910 ± 529	984 ± 796	718 ± 542	781 ± 568
TBil (mg/dℓ)	0.10 ± 0.04	0.10 ± 0.04	0.10 ± 0.05	0.09 ± 0.03
Glucose (mg/dℓ)	135 ± 15.8	125 ± 12.5	139 ± 17.7	130 ± 9.64
TCho (mg/dℓ)	78.7 ± 16.9	75.1 ± 12.3	73.5 ± 12.1	64.1 ± 8.41
Triglyceride (mg/dℓ)	48.2 ± 14.5	47.6 ± 12.7	40.4 ± 12.9	42.7 ± 11.9
TP (g/dℓ)	7.26 ± 0.26	7.08 ± 0.30	7.31 ± 0.34	7.19 ± 0.25
Albumin (g/dℓ)	4.75 ± 0.14	4.69 ± 0.18	4.76 ± 0.16	4.71 ± 0.15
BUN (mg/dℓ)	21.2 ± 2.70	21.5 ± 3.92	20.4 ± 2.34	22.2 ± 3.90
Creatinine (mg/dℓ)	0.51 ± 0.05	0.49 ± 0.04	0.51 ± 0.02	0.52 ± 0.02
IP (mg/dℓ)	8.08 ± 0.93	8.11 ± 0.62	8.49 ± 0.83	7.95 ± 0.74
Ca (mg/dℓ)	11.8 ± 0.66	11.2 ± 0.44	11.3 ± 0.44	11.0 ± 0.41

AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; GGT, gamma glutamyl transferase; CPK, creatine phosphokinase; LDH, lactate dehydrogenase; TBil, total bilirubin; TCho, total cholesterol; TP, total protein; BUN, blood urea nitrogen; IP, inorganic phosphorus; and Ca, calcium.

Values are presented as mean ± standard deviation

5) 부검 소견(육안소견)

4주 반복 노출군 및 4주 회복군의 계획 부검 시 랫드의 표피, 체공 및 모든 장기를 육안적으로 관찰하였다. 모든 시험동물에서 시험물질과 관련된 것으로 판단되는 이상소견은 관찰되지 않았다.

6) 장기중량 측정

계획 부검 시 절대 장기중량 측정결과 4주 반복 노출군 및 4주 회복군 모든 시험군의 폐에서 대조군에 비해 유의한 증가가 관찰되었다. 상대 장기중량 측정 결과 역시 동일한 결과가 관찰되었다. 4주 반복 노출군의 저농도, 중농도 및 고농도의 절대 장기중량은 대조군에 비해 53.9%, 68.6%, 60.9% 증가하였고, 상대 장기중량은 대조군에 비해 54.0%, 62.9%, 60.4% 증가하였다. 4주 회복군의 저농도, 중농도 및 고농도 절대 장기중량은 대조군에 비해 23.9%, 76%, 104.5% 증가하였고, 상대 장기중량은 대조군에 비해 24.9%, 93.3%, 109.4% 증가하였다(표 16, 17).

<표 16> 4주 반복 노출군의 장기 중량 변화

	Control	Low	Medium	High
No. of animals	8	8	8	8
Body weight (g)	346.3±18.53	345.4±21.98	359.2±19.99	347.1±19.53
Lung (g)	1.391±0.094	2.141±0.270**	2.345±0.114**	2.238±0.149**
per body weight (%)	0.402±0.016	0.619±0.059**	0.655±0.047**	0.645±0.034**
Liver (g)	9.395±0.664	9.490±0.867	9.843±0.981	9.189±0.585
per body weight (%)	2.713±0.110	2.745±0.124	2.735±0.155	2.650±0.149
Kidney (g)	2.325±0.161	2.424±0.142	2.456±0.218	2.345±0.118
per body weight (%)	0.672±0.043	0.703±0.043	0.683±0.040	0.676±0.032
Spleen (g)	0.651±0.085	0.644±0.060	0.657±0.070	0.610±0.072
per body weight (%)	0.188±0.018	0.186±0.011	0.183±0.014	0.176±0.021
Brain (g)	2.038±0.084	2.006±0.049	2.044±0.094	1.981±0.086
per body weight (%)	0.590±0.033	0.583±0.038	0.571±0.041	0.572±0.035

Values are presented as mean ± standard deviation

**, P<0.01 versus control

<표 17> 4주 회복군의 장기 중량 변화

	Control	Low	Medium	High
No. of animals	8	8	7	8
Body weight (g)	499.9±28.93	495.9±25.25	464.6±44.10	488.6±30.07
Lung (g)	1.709±0.132	2.118±0.191**	3.077±0.482**	3.495±0.460**
per body weight (%)	0.342±0.027	0.427±0.030**	0.661±0.063**	0.716±0.082**
Liver (g)	13.75±1.675	13.49±0.918	12.39±1.509	13.02±1.021
per body weight (%)	2.745±0.224	2.720±0.144	2.664±0.135	2.667±0.151
Kidney (g)	3.071±0.292	2.974 0.173	2.829±0.357	2.890±0.148
per body weight (%)	0.614±0.033	0.600±0.033	0.610±0.058	0.592±0.029
Spleen (g)	0.926±0.095	0.862 0.116	0.828±0.080	0.853±0.034
per body weight (%)	0.185±0.017	0.174±0.021	0.178±0.010	0.175±0.013
Brain (g)	2.140±0.098	2.113 0.055	2.073±0.072	2.066±0.099
per body weight (%)	0.428±0.014	0.427±0.018	0.450±0.049	0.425±0.041

Values are presented as mean ± standard deviation

**, P<0.01 versus control

7) 조직병리 검사

산화 네오디뮴의 흡입노출에 의해 가장 영향을 많이 받을 것으로 예상되는 폐의 조직병리 검사를 실시하였다. 4주 반복 노출군에서 폐포단백증(alveolar proteinosis)이 모든 시험군에서 각각 8례가 관찰되었고, 폐포 세포(type Ⅱ)의 과형성 및 비대(hyperplasia/ hypertrophy)가 저농도 및 고농도에서 각각 1례씩, 폐포 대식세포의 응집(aggregation)이 저농도 및 고농도에서 각각 5례, 1례씩 관찰되었다. 또한, 폐포 및 혈관주위세포의 염증(inflammation)이 대조군, 저농도, 중농도 및 고농도에서 각각 2례, 3례, 5례 및 4례가 관찰되었으며, 폐문 림프절(hilar lymph node)에서 대식세포의 응집이 저농도 및 고농도에서 각각 1례, 2례가 관찰되었다. 4주 회복군에서는 폐포단백증(alveolar proteinosis)이 저농도, 중농도 및 고농도에서 각각 6례, 7례, 8례가 관찰되었고, 폐포 세포(type Ⅱ)의 과형성 및 비대(hyperplasia/ hypertrophy)가 고농도에서 2례 관찰되었으며, 폐포 대식세포의 응집(aggregation)이 저농도, 중농도 및 고농도에서 각각 6례, 5례, 2례 관찰되었다. 폐포 및 혈관주위세포의 염증(inflammation)이 대조군, 저농도, 중농도 및 고농도에서 각각 3례, 1례, 3례 및 4례가 관찰되었으며, 폐문 림프절(hilar lymph node)에서 대식세포의 응집이 중농도 및 고농도에서 각각 2례, 4례가 관찰되었다(표 8, 19). 현미경상은 <그림 10> 및 <그림 11>과 같다. 폐포단백증(alveolar proteinosis, 화살표 모양 표시), 폐포 대식세포의 응집(aloveolar macrophage aggregation, 화살촉모양), 폐포세포의 과형성 및 비대(alveolar type Ⅱ cells hyperplasia/ hypertrophy, 흰색의 화살촉모양) 및 염증세포 침윤(inflammation cell infiltration, 별표 표시)이 관찰된다.

<표 18> 4주 반복 노출군 폐조직의 조직병리학적 소견

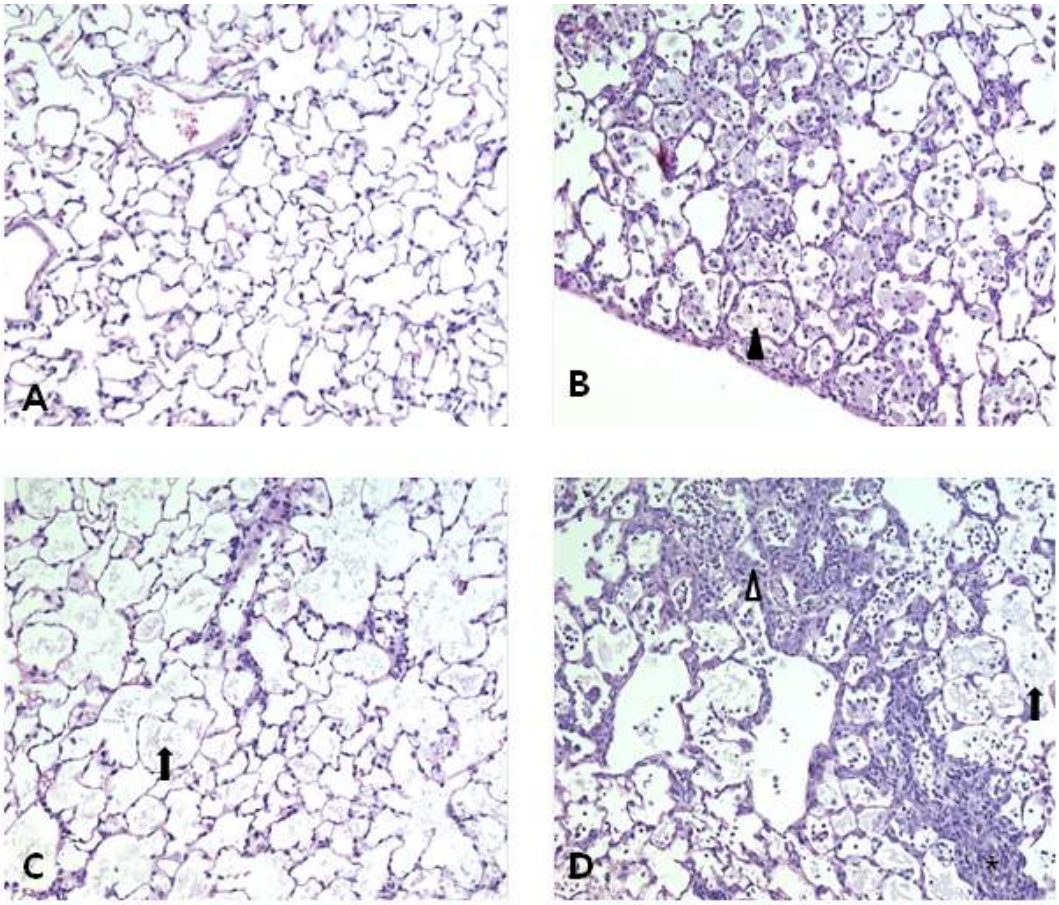
Findings	Grade	Control	Low	Middle	High
No. of animals		8	8	8	8
Normal appearance		6	0	0	0
Lung					
Alveolar proteinosis	±	0	7	7	6
	+	0	1	1	1
	++	0	0	0	1
Hyperplasia/hypertrophy, alveolar type II cells	±	0	1	0	1
Aggregation, alveolar macrophages	±	0	2	0	1
	+	0	3	0	0
Infiltration, inflammatory cells, alveolar/perivascular	±	2	3	5	2
	+	0	0	0	1
	++	0	0	0	1
Lymph node, hilar					
Aggregation, macrophages	±	0	1	0	1
	+	0	0	0	1

Grade: ±, minimal; +, mild; ++, moderate; and +++, marked

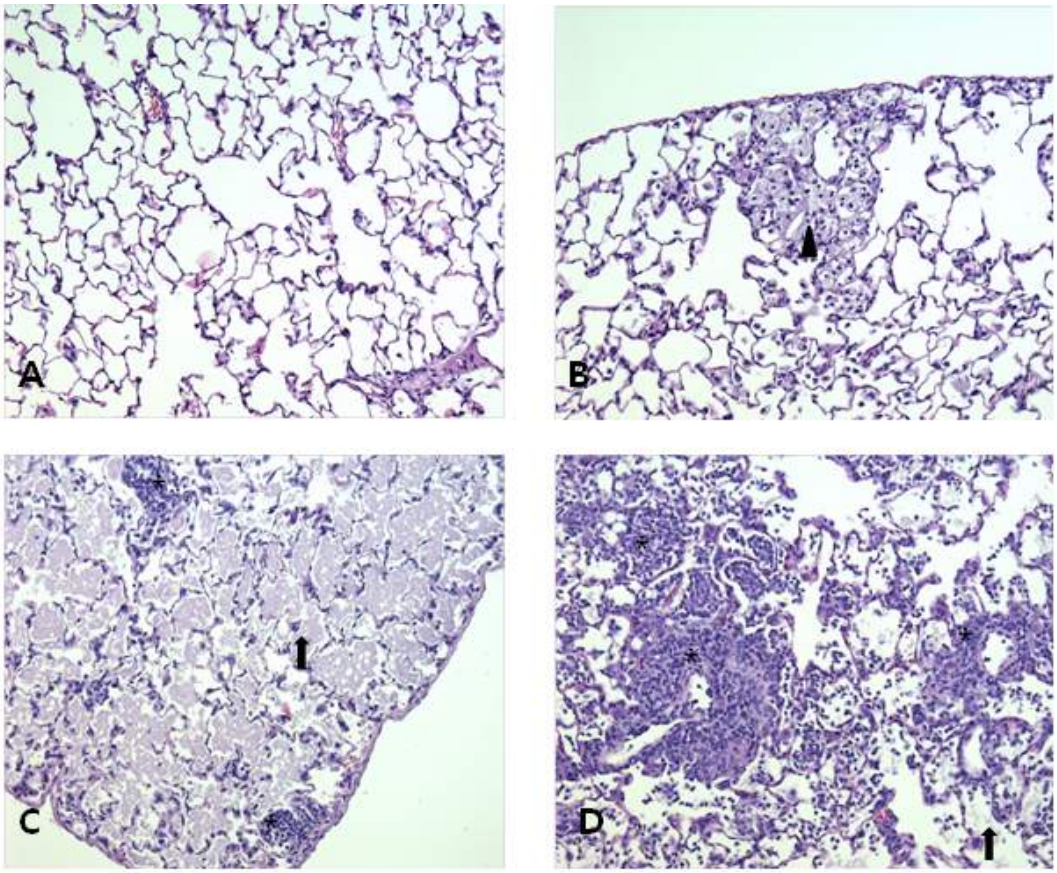
<표 19> 4주 회복군 폐조직의 조직병리학적 소견

Findings	Grade	Control	Low	Middle	High
No. of animals		8	8	7	8
Normal appearance		5	1	0	0
Lung					
Alveolar proteinosis	±	0	6	5	0
	+	0	0	1	6
	++	0	0	0	2
	+++	0	0	1	0
Hyperplasia/hypertrophy, alveolar type II cells	±	0	0	0	1
	+	0	0	0	1
Aggregation, alveolar macrophages	±	0	6	3	1
	+	0	0	1	1
	++	0	0	1	0
Infiltration, inflammatory cells, alveolar/perivascular	±	3	1	2	2
	+	0	0	1	1
	+++	0	0	0	1
Lymph node, hilar					
Aggregation, macrophages	±	0	0	1	0
	+	0	0	1	0
	++	0	0	0	3
	+++	0	0	0	1

Grade: ±, minimal; +, mild; ++, moderate; and +++, marked



[그림 10] 4주 반복 노출군의 폐 조직병리 사진(200배)
(A; control, B; low, C; middle, D; high)



[그림 11] 4주 회복군의 폐 조직병리 사진(200배)
(A; control, B; low, C; middle, D; high)

8) 폐의 산화적 손상 지표 확인

산화 네오디뮴의 4주 반복 노출 및 4주 회복 시 폐에 손상을 주는 요인을 확인하기 위하여 산화적 손상 지표를 확인하였다. 4주 반복 노출군의 중농도 및 고농도군에서 glutathione(GHS)의 대조군에 비해 유의적인 감소가 측정되었며, 4주 회복군에서는 고농도군만 대조군에 비해 유의적인 감소가 관찰되었다. Catalase 활성 측정결과 4주 반복 노출군의 저농도군에서 대조군에 비해

감소된 것이 관찰되었으나, 다른 시험군에서는 대조군에 비해 유의한 변화는 관찰되지 않았다. 4주 회복군에서도 모든 시험군에서 대조군에 비해 유의한 변화는 관찰되지 않았다. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) 측정결과 4주 반복 노출군 및 4주 회복군에서 대조군에 비해 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

<표 20> 폐조직에서 산화적 손상 지표 변화

	Control	Low	Middle	High
4-week exposure				
GSH (nmol/mg protein)	1.97±0.55	1.34±0.90	0.69±0.25**	0.48±0.22**
Catalase (units/mg protein)	35.51±8.82	22.25±2.37*	26.59±7.95	38.32±4.59
TBARS(uM)	178.45±207.47	214.43±253.80	190.78±221.62	287.87±232.97
4-weeks recovery				
GSH (nmol/mg protein)	1.49±0.59	1.16±0.20	1.05±0.19	0.55±0.30*
Catalase (units/mg protein)	31.55±7.99	28.86±4.03	36.96±4.18	33.01±6.83
TBARS(uM)	218.38±156.19	126.51±186.45	221.61±201.35	272.97±220.16

GSH, glutathione; TBARS, Thiobarbituric acid reactive substances

Values are presented as mean ± standard deviation

*, P<0.05 versus control; **, P<0.01 versus control.

Ⅳ. 고 찰

본 연구는 첨단산업을 비롯하여 산업적 측면에서 그 활용도가 높은 희토류를 취급하는 근로자의 건강장해 예방을 위해 수행되었다. 많은 희토류 중 활용성과 경제성이 높아 앞으로도 산업적으로 수요가 증가할 것으로 예상되는 네오디뮴에 대해 연구를 수행하였으며, 특히 크기가 작은 나노물질의 노출에 의해 유해성이 증가할 수 있어 나노크기의 노출에 의한 영향을 확인하고자 하였다. 근로자 건강장해 예방을 위해서는 유해성·위험성 평가를 실시하여 관리가 필요하다고 판단되는 화학물질에 대한 규제를 하는 것이 필요하며, 이를 위해서는 화학물질의 독성에 대한 연구자료 등 위험성을 조사·분석하여 인체에 미치는 유해한 영향을 추정하는 과정이 필요하다. 이에 네오디뮴에 대한 독성시험자료를 통해 NOAEL (No-Observed-Adverse -Effect-Level) 또는 LOAEL(Lowest-Observed-Adverse-Effect-Level)을 도출하고자 하였다.

희토류 작업장은 근로자 건강 및 환경에 많은 위험요소를 내포하고 있으며, 작업과정 중 발생한 먼지 등의 피부접촉, 섭취 및 미세먼저의 흡입에 의해 인체에 직접 노출될 수 있다(신서호 등, 2016). 이 중 흡입에 의한 유해성 정보를 얻기 위해서는 흡입독성을 할 수 있는 설비, 인력 등이 필요하기 때문에 관련 자료는 부족한 실정이다.

나노 크기의 산화 네오디뮴을 노출시키기 위해 먼저 시험물질의 특성을 파악하였다. BET(Brunauer, Emmett and Teller) 분석을 통해 산화 네오디뮴의 크기가 100 nm 이하인 49.05 nm 로 확인되었으나, 실제 노출을 위한 수분산에서의 입자크기와 MMAD(Mass Median Aerodynamic Diameter)는 100 nm를 훨씬 초과하는 크기로 측정되었다. 나노 크기로 노출하기 위해 수분산에 초음파 처리를 통해서 에너지를 가하였지만, 나노 크기로 만들기는 쉽지 않

았다. 네오디뮴과 구조적으로 유사한 란탄을 이용한 기존연구에서, BET 분석을 통한 산화란탄의 입자크기는 103.6 nm로 확인 되었으며, 산화란탄 수분산액에 초음파 에너지를 가하면서 입자크기 및 PDI를 측정한 결과 에너지가 증가함에 따라 입자크기가 작아져 100 ㎚ 수준에서 입자크기가 안정화 되는 결과가 관찰되었다(임철홍 등, 2015). 이는 구조적으로 유사한 물질이지만, 입자 크기가 작을수록 보다 쉽게 응집(aggregation)이 잘되는 나노 물질의 특성이 여러 원인 중 하나일 수 있다고 판단된다. 이러한 연구 한계점은 향후 지속적으로 나노물질노출의 용이성과 안정성 및 안전성 등을 고려한 나노 물질 노출방법에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

입자상물질의 측정방법은 중량농도 측정, 입자의 개수농도 측정, 입경분포 측정, 입경분포와 가스성분 동시 분석법 등으로 구분된다. 중량법의 경우 정도가 높고 화학성분분석시료를 채취할 수 있다는 장점이 있으나 시험기간이 상대적으로 길고 Batch 방법으로 불편한 점이 많다(김민영 등, 2004). 이에 입자수를 실시간으로 계측하여 즉시 노출량을 조절할 수 있는 portable aerosol spectrometer(Optical Particle counter, OPC)를 활용하여 보정계수를 통해 노출농도를 측정하면서 유량 조절을 통해 농도를 유지 하였다. 네오디뮴과 구조적으로 유사한 란탄의 시험결과(임철홍 등, 2015)와 중량법 및 ICP 분석결과를 참조하여 노출용량과 OPC를 통한 분석결과가 부합되는 것을 확인 하였다(자료제시 하지 않음).

4주 반복 노출기간 및 4주 회복기간 동안 산화 네오디뮴의 노출과 관련된 임상증상 및 체중변화는 관찰되지 않았다. 또한, 산화 네오디뮴의 4주 반복 노출군 및 4주 회복군에서 혈액학 및 혈액생화학 분석 결과 대조군에 비해 유의한 차이가 관찰되지 않은 것으로 미루어 전신에 미치는 영향은 거의 없는 것으로 사료된다.

4주 반복 노출군 주요 장기별 네오디뮴의 분석 결과, 폐에서 네오디뮴 수치가 가장 높게 나타났으며, 그 다음으로 간, 비장, 뇌, 신장 순으로 관찰되었지

만, 4주 회복군에서는 폐, 간, 비장, 신장, 뇌 순으로 관찰되었다. 4주 회복군의 고농도군은 4주 반복 노출군에 비해 폐, 뇌, 간, 비장, 신장 각각 약 34.4%, 49.5%, 31.1%, 55.1%, 23.7% 로 감소하는 경향이 관찰되었다. 저농도 및 중농도 시험군에서도 4주 회복군에서 모든 장기에서 4주 노출군보다 수치가 낮아졌다.

산화 네오디뮴의 4주 반복 노출군 및 4주 회복군의 폐의 국소적인 영향을 확인하기 위해 기관지폐포세척액의 염증성 세포 분포를 확인하였다. 4주 반복 노출군의 총세포수, 대식세포 및 다형핵백혈구는 노출농도가 높아지면서 대조군에 비해 유의적으로 증가하였으나, 4주 회복군에서는 중농도 또는 고농도군에서 대조군에 비해 유의적으로 증가하였다. 4주 회복군의 총세포수, 대식세포 및 다형핵백혈구는 4주 반복 노출군에 비해 줄어드는 경향이 관찰되었으나 고농도에서는 오히려 증가하는 경향이 관찰되었다. 이는 일정노출농도 이하에서는 회복기간을 통해 염증성 변화가 회복이 되는 것을 시사한다.

폐의 세포손상성 변화를 확인하기 위해 기관지폐포세척액의 세포손상성 지표를 확인하였다. 4주 반복 노출군 LDH 및 albumin 측정결과, 모든 시험군에서 대조군에 비해 유의적인 증가가 관찰되었으나, 4주 회복군에서는 대조군에 비해 유의한 증가는 관찰되었지만, 고농도군을 제외한 나머지 시험군에서는 4주 반복 노출군에 비해 수치가 감소하였다. 이는 고농도군의 경우 폐에서 지속적인 영향을 주는 것으로 보여지며, 네오디뮴과 유사한 란탄의 경우와 유사한 결과를 보여주고 있다(임철홍 등, 2015).

노출기간 및 회복기간 중 염증반응 관련 세포전달물질인 IL-6는 4주 반복 노출군에서 중농도 및 고농도에서 대조군에 비해 유의한 증가가 관찰되었으나, 4주 회복군에서는 고농도만 유의적인 증가가 관찰되었다. 또한, 4주 회복군의 수치는 4주 반복 노출군에 비해 감소하는 경향이 관찰되었다. 한편, TNF-α는 이와 다르게 4주 회복군과 4주 반복 노출군에서 중농도 및 고농도

군에서 감소하는 경향은 관찰되지 않았다. 이는 기관지폐포세척액의 염증성 세포 분포의 결과와 유사한 경향을 보여주고 있다.

한편, 폐의 산화적 손상 지표를 확인결과, GSH의 경우 4주 반복 노출군의 중농도 및 고농도에서 대조군에 비해 유의적으로 감소하는 결과가 관찰되었으나, 다른 지표에서는 특이한 변화는 관찰되지 않았다.

4주 반복 노출군 및 4주 회복군의 계획부검을 실시한 결과, 시험물질과 관련되어 보이는 특이한 소견은 관찰되지 않았지만, 절대 및 상대 장기중량 측정결과 4주 반복 노출군 및 4주 회복군 모든 시험군에서 대조군에 비해 유의적인 증가가 관찰되었다. 이는 폐의 조직병리학적 변화에 의한 것으로 판단된다.

폐의 조직병리학적 관찰 결과, 폐포단백증(alveolar proteinosis), 폐포 세포(type Ⅱ)의 과형성 및 비대(hyperplasia/hypertrophy), 폐포 대식세포의 응집(aggregation), 폐포 및 혈관주위세포의 염증(inflammation)이 관찰되었으며, 폐문 림프절(hilar lymph node)에서 대식세포의 응집이 관찰되었다. 4주 반복 노출군에서 관찰된 병리학적 소견은 중농도 이하의 시험군의 4주 회복군에서 병리학적 소견이 점차 감소하는 경향이 관찰되었다. 이는 폐가 일정 회복기간을 통해 회복되는 가역적 변화로 판단된다.

근로자 근로자 건강장해 예방을 위한 무영향 농도를 도출하기 위해 무유해용량(NOAEL, No-Observed-Adverse-Effect-Level)를 산정하였다. 무유해영향은 무영향량(NOEL, No-Observed-Effect-Level)과는 개념이 다르다. 화학물질에 의한 영향이 전혀 나타나지 않는 용량이 무영향량이라면, 영향이 나타나더라도 실질적으로 인체/생체에 악영향을 미치는 정도에 따라 그 용량이 결정된다. 앞서 언급한 나노 크기의 시험물질이 실제 노출에서는 그 크기가 유지되지 않은 본 연구의 한계점은 고려해야 할 필요성이 있지만, 본 연구 결과를 바탕으로 산화 네오디뮴 4주 반복 흡입 노출에 의해 저농도군에서도 시험물질에 의한 변화가 관찰되었기 때문에 무영향량(NOAEL)의 확인은 이

루어 지지 않았다. 하지만, 본 연구결과를 바탕으로 최소유해용량(LOAEL)을 저농도인 0.5 ㎎/㎥으로 산정하여 제안할 수 있다. 또한, 기관지폐포 염증성 세포 및 세포손상성 변화에서 중농도에서도 유해한 영향이 관찰되었고, 폐중량의 변화와 조직병리 소견에서도 중농도에 영향이 있었지만, 4주 회복군에서는 그 영향이 점차 감소하는 것을 통해 이번 시험의 조건에서 산화 네오디뮴의 흡입노출은 회복기간을 통한 회복성이 있는 것으로 판단 할 수 있다.

Ⅴ. 결 론

나노 산화 네오디뮴을 수컷 SD 랫드와 비부노출형 흡입챔버를 이용하여 0.5 ㎎/㎥(저농도), 2.5 ㎎/㎥(중농도), 10 ㎎/㎥(고농도)의 농도로 4주간(6시간/일, 5일/주) 노출 및 4주 회복 후 독성영향을 관찰한 결과는 다음과 같다.

1. 산화 네오디뮴의 4주 반복 노출군의 폐에서 저농도군, 중농도군, 고농도군 각각 8.6 ± 2.6 ㎍/g, 59.0 ± 19.2 ㎍/g, 183.0 ± 25.9 ㎍/g 으로 관찰되었고, 4주 회복기간 후 4주 반복 노출군에 비해 저농도군, 중농도군, 고농도군 각각 약 22.1%, 34.4%, 34.6% 감소하는 경향이 관찰되었다.

2. 산화 네오디뮴의 4주 노출에 의한 체중, 일반증상 및 혈액생화학 검사 결과 전신에 미치는 영향은 거의 없는 것으로 판단된다.

3. 4주 회복군의 기관지폐포 염증성 세포 변화, 세포손상성 변화, 폐중량의 변화 및 조직병리 소견에서 4주 반복 노출군에 비해 그 영향이 회복되는 경향을 보였으나, 고농도에서는 영향이 지속되는 결과를 보였다.

이상의 결과로 산화 네오디뮴의 LOAEL은 0.5 ㎎/㎥이 제안된다.

참고문헌

김강윤, 박만철. 2013. 희소금속류의 유해성 평가 대상물질 선정에 관한 연구. 한국산업안전보건공단, 산업안전보건연구원 2013년 연구보고서.

김민영, 조석주. 2004. Portable Aerosol Spectrometer의 실용성 평가. 한국대기환경학회 2004 춘계학술대회 논문집

김부용, 오종혁. 2011. 중국의 희토류산업 규제 강화에 따른 영향과 시사점. KIEP 대외경제정책연구원 연구자료 11-23

김종규, 김수진, 임경택. 2012. 희토류 금속화합물 초미세입자의 분자독성학적 연구-란타늄(La_2O_3) 및 네오디뮴(Nd_2O_3)을 중심으로. 한국산업안전보건공단, 산업안전보건연구원 2012년 연구보고서.

김종규, 김수진, 강민구. 2014. 희토류 금속화합물에 의한 활성산소종 발생 및 폐독성 연구-Nd_2O_3 기도투여에 따른 흡입독성. 한국산업안전보건공단, 산업안전보건연구원 2014년 연구보고서.

김택수, 김보경, 김범성, 박경태. 희토류 산업의 현황. 대한금속・재료학회 재료마당, 8-16. 2014.

고용노동부. 2013. 고용노동부고시 제2013-38호. 화학물질 및 물리적 인자의 노출기준

임철홍, 김용순, 신서호. 2015. 실험동물 이용한 나노 란탄산화물(La2O3)의 흡입독성 연구. 한국산업안전보건공단, 산업안전보건연구원 2015년 연구보고서.

위키백과, 희토류 원소. Available from: https://ko.wikipedia.org

위키백과, 네오디뮴. Available from: https://ko.wikipedia.org

신서호, 임경택, 김종춘. 2016. 산업보건 측면에서의 희토류 건강영향 평가. 한국산업보건학회지, 26(3):237-252

Ronald J. Palmer, John L. Butenhoff and Jeffrey B. Stevens. Cytotoxicity of the Rare Earth Metals Cerium, Lanthanum, and Neodymium in Vitro: Comparison with Cadmium in a Pulmonary Macrophage Primary Culture System. Environmental Research 43, 142-156(1987)

Abstract

Study on derivation of no-observed-effect-concentration using inhalation toxicity data for rare earth materials

Yong-Soon Kim, Yong-Hoon Lee, Seo-Ho Sin

Chemicals Toxicity Research Bureau, Occupational Safety and Health Research Institute, KOSHA
#339-30, Expo-ro Yuseong-gu, Daejeon, 34122, Korea

Neodymium, a rare earth metal, have been used in extremely high power applications, various other substrate crystals, optical glasses, component of magnets. Neodymium is not found naturally in metallic form, and it is usually refined for general use. For this reason occupational handler in the workplace can be exposure from several routes. Male Sprague-Dawley rats have been exposed to 0.5 ㎎/㎥, 2.5 ㎎/㎥and 10 ㎎/㎥ of neodymium oxide aerosols for 4 weeks (6 hours a day, 5 days per week) in the nose-only inhalation chambers. Particles size was measured by optical particle counter (OPC) during exposure. There was no clinical symptom and unusual change of mean body weight during exposure and recovery period. The contents of neodymium in the lung were 8.6 ± 2.6 ㎍/g, 59.0 ± 19.2 ㎍/g, and 183.0 ± 25.9 ㎍/g

of low, middle and high exposure group each after 4-week exposure. The cell damage and inflammatory effect indicators including total cells, polymorphonuclear leukocytes (PMNs) lactate dehydrogenase (LDH), albumin, interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF-α) values in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were increased in the low and/or to high exposure group after 4-week exposure. The frequency of histopathological view and lung weight were also increased in the low to high exposure group after 4-week exposure. However, cell damage and inflammatory effect indicators, histopathological view and lung weight were decreased after 4-week recovery groups compared to 4-week exposure groups. Based on these results, 0.5 ㎎/㎥ might be suggested as lowest observed adverse effect level (LOAEL).

<<연 구 진>>

연 구 기 관 : **한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원**

연구책임자 : 김 용 순(연구위원, 수의학박사, 화학물질독성연구실)
연 구 원 : 이 용 훈(연구위원, 수의학박사, 화학물질독성연구실)
연 구 원 : 신 서 호(연 구 원, 수의학석사, 화학물질독성연구실)

<<연 구 기 간>>

2016. 1. 1.~ 2016. 11. 30.

본 연구보고서에 기재된 내용은 연구책임자의 개인적 견해이며, 우리 연구원의 공식견해와 다를 수도 있음을 알려드립니다.

산업안전보건연구원장

흡입독성자료를 활용한 희토류물질의 인체무영향 농도 도출 연구

(2016-연구원-1252)

발 행 일 : 2016년 11월
발 행 인 : 산업안전보건연구원 원 장 김장호
연구책임자 : 화학물질독성연구실 연구위원 김용순
발 행 처 : 안전보건공단 산업안전보건연구원
주 소 : (44429) 울산광역시 중구 종가로 400
전 화 : (042) 869-8542
F A X : (042) 869-8691
Homepage : http://oshri.kosha.or.kr