

연구보고서

전자현미경을 이용한 호흡기계 조직 손상 연구

이용훈·정용현·한정희

산업재해예방
안전보건공단
산업안전보건연구원



요 약 문

1. 연구제목

전자현미경을 이용한 호흡기계 조직 손상 연구

2. 연구 필요성 및 목적

작업장에서 화학물질이 노출되면 1차적으로 호흡기에 영향을 일으킨다. 그러므로 호흡기계 손상성 화학물질을 확인하기 위한 고감도 진단 기법은 독성시험에서 필수이다. 전자현미경은 배율이 최대 100 만배까지 확대가 가능하여 고감도 장비로 미토콘드리아, 조면소포체, 골지체, 핵의 크로마틴 등 세포 미세소기관 변화와 시험물질의 분포, 미세한 세포 표면 변화 등을 관찰 할 수 있어, 화학물질 독성 기전에 대한 세부 정보를 제공 할 수 있다. 따라서, 본 연구는 독성시험에서 전자현미경을 이용하여 화학물질에 의한 호흡기계 손상 지표를 확인하고자한다.

3. 연구내용 및 방법

- 화학물질독성연구실 연구 및 사업 과제 시험 중 호흡기계 손상이 확인 된 대상시험의 시험동물로부터 호흡기계 조직 절취
- 광학 현미경 및 전자현미경 관찰 위한 표본 제작

- 광학현미경과 전자현미경을 이용한 호흡기계 조직 손상 지표 비교 확인 및 고찰

4. 연구결과

랫드를 이용한 Calcium Sulfate 급성 흡입독성시험에서는 고용량 노출군의 랫드의 비강을 광학현미경에서 관찰한 결과, 비갑개의 점막 하 층혈 소견이 관찰되었으나, 이는 부검 시 정상적인 범위 안에 관찰될 수 있는 정도로 판단되었으며, 그 외 특이적인 소견은 관찰되지 않았다. 하지만 주사전자현미경에서 관찰한 결과, 비강 Level 1의 비갑개 점막 부위에서 산발적인 이행상피세포 탈락이 관찰되었고, 실모양의 섬유소와, 적혈구, 혈소판 및 섬유소가 탈락 상피로 추정되는 구조물과 혼재되어 있는 것이 관찰되었다. 따라서 본 소견은 미세출혈로 판단되었다.

랫드를 이용한 Methyl Formate 아만성 흡입독성시험에서는 Methyl Formate 고용량군 랫드의 비강 Level 3의 사골갑개 부위를 광학현미경에서 관찰한 결과, 후각 상피세포의 섬모가 소실되었으며, 상피의 공포화 관찰, 세포 층구조 소실 및 핵의 응축이 관찰되었다. 따라서, 본 소견은 후각상피 세포 변성으로 진단하였다. 투과전자현미경에서 관찰한 결과, 후각상피의 신경지각후각세포, 지지세포 간의 공간의 확장이 관찰되었고, 이들 세포의 섬모소실이 관찰되었다, 후각신경세포의 핵소체의 응축 관찰이 관찰되었다. 일부 세포의 세포질에서는 다수의 공포화가 관찰되었다.

흡입독성자료를 활용한 희토류 물질의 인체 무영향 도출 연구에서는 나노 네오디움 산화물 고용량군 랫드의 폐를 광학현미경에서 관찰한 결과, 폐포의 내강 안에 창백한 호산성 물질이 차 있는 것이 관찰되었다. 그리고 폐포 내에서 제2형 폐포 상피세포들이 미미하게 비대 되어 있는 것이 관찰되었다. 따라서, 본 소견은 폐포 지질단백증으로 진단하였다. 투과전자현미경에서 관찰한 결과, 폐포

내강의 단백질성의 물질과 전자밀도가 높은 시험물질인 나노입자가 관찰되었다. 그리고 폐포의 제2형 폐포상피세포의 세포질에서 확장된 층판소체가 다수 관찰되었다. 또한, 핵의 진정염색질 부위가 이질염색질 부위보다 커진 것이 관찰되었다.

실험동물을 이용한 나노 란탄산화물(La_2O_3)의 흡입독성 연구에서는 나노란탄산화물 고용량 노출군의 랫드의 폐를 광학현미경에서 관찰 한 결과, 폐포의 내강이 대부분 거품성의 대식세포가 가득 차 있었으며, 일부 폐포에서 조직구로 이루어진 염증세포가 침윤되어 있는 것이 관찰되었으며, 그 주위로 죽은 폐포 대식세포 및 탈락세포가 관찰되었다. 그리고 일부 폐포 상피에서는 제2형 폐포세포 증식이 관찰되었다. 따라서, 본 소견은 폐포 조직구증으로 판단하였다. 투과전자현미경에서 관찰 결과, 폐포 내강의 폐포 대식세포의 세포질에서 다수의 층판소체와 시험물질인 나노입자가 관찰되었으며 세포 주위로 단백질성 물질이 관찰되었다. 그리고 폐포의 제2형 폐포상피세포의 세포질에서는 층판소체의 확장 및 기저막과 세포질 사이에 공간이 확장되고, 미토콘드리아에서 시험물질의 축적이 관찰되었다. 핵에서 진정염색질 부위가 이질염색질부위보다 넓게 관찰되었다.

화학물질 노출에 의한 유전자돌연변이(발암)의 조기 확인(II)(실험동물을 이용한 고감도 발암성 확인기법의 검증)에서 우레탄 투여군 마우스의 폐를 광학현미경에서 관찰한 결과, 정상 폐조직과 경계가 명확한 청자색의 병소가 관찰되었으나 주변조직으로 침습은 관찰되지 않았다. 세포의 세포질은 호염성인 원주상피로 유두상 구조를 이루고 있었다. 세포의 형태는 대부분 일정하였으며, 세포 다형성과 유사분열은 관찰되지 않았다. 따라서, 소견의 진단명은 세기관지-폐포 샘종로 진단하였다. 투과전자현미경에서 관찰한 결과, 종양은 제2형 폐포상피세포 유래인 것을 확인하였으며, 핵에서 진정염색질 부위가

이질염색질 부위보다 넓게 관찰되었고, 종양의 세포질에서는 증판소체가 관찰되었다.

5. 활용방안 및 기대성과

- 생체조직에서 전자현미경 조직 검체제작 기법 확립
- 독성시험에서 호흡기계 손상 기전 연구 활용

6. 중심어

전자현미경, 독성병리, 호흡기계, 독성시험

7. 참고문헌 및 연락처

- Dumkova J, Vrlikova L, Vecera Z et al. Inhaled Cadmium Oxide Nanoparticles: Their in Vivo Fate and Effect on Target Organs. *Int J Mol Sci.* 2016; 3;17(6). pii: E874. doi: 10.3390/ijms17060874.
- Gamer AO, Leibold E, Deckardt K et al. The effects of Styrene on Lung cells in Female Mice and Rats. *Food Chem Toxicol.* 2004;42(10);1655-67.
- Hook GE. Alveolar Proteinosis and Phospholipidoses of the Lungs. *Toxicol Pathol.* 1991;19:482-513.
- Hubbs AF, Goldsmith WT, Kashon ML et al Respiratory Toxicologic Pathology of Inhaled Diacetyl in Sprague-Dawley Rats. *Toxicol Pathol.* 2008;36(2):330-44.
- Li B, Ze Y, Sun Q et al. Molecular Mechanisms of Nanosized Titanium Dioxide-Induced Pulmonary Injury in Mice. *PLoS One.* 2013;8(2):e55563.

doi: 10.1371/journal.pone.0055563. Epub 2013 Feb 7.

Norman FC. Ultrastructural Pathology the Comparative Cellular Basis of Disease, Second Edition, Wiley-Blackwell, Iowa, USA, 2009, pp2-22.

□ 연락처

- ▶ 연구책임자 : 화학물질독성연구실 연구위원 이용훈
- ▶ 연구원 담당자 : 산업안전보건연구원 화학물질독성연구실 연구위원 이용훈
- ▶ T:042-869-0532 F:042-863-8694 E-mail: dvmone@kosha.or.kr

차 례

I. 서론	1
1. 연구배경	1
1) 연구필요성	1
2) 전자현미경 개요	2
3) 선행연구	4
2. 연구목표	5
II. 연구방법	6
1. 대상시험	6
2. 광학현미경 검체제작 절차	10
3. 주사전자현미경 검체제작 절차	15
4. 투과전자현미경 검체제작 절차	19
5. 광학현미경과 전자현미경 상에서 호흡기계 조직 손상 관찰 및 고찰	24
III. 연구결과	25
1. 광학현미경과 전자현미경 상에서 호흡기계 손상 관찰	25
1) 랫드를 이용한 calcium sulfate의 급성흡입독성시험	25
2) 랫드를 이용한 methyl formate 아만 흡입독성시험	29
3) 흡입독성자료를 활용한 회토류 물질의 인체 무영향 도출 연구	33

4) 실험동물을 이용한 나노 란탄산화물(La_2O_3)의 흡입독성 연구	37
5) 화학물질 노출에 의한 유전자돌연변이(발암)의 조기 확인(II) (실험동물을 이용한 고감도 발암성 확인기법의 검증)	42
IV. 고찰	46
V. 결론	50
VI. 참고문헌	53
Abstract	57

표 차 례

<표 1> 투과전자현미경과 주사전자현미경 비교	4
<표 2> 랫드를 이용한 Calcium Sulfate(CAS No. 10034-76-1)의 급성흡입독성 시험의 군구성	6
<표 3> 랫드를 이용한 Methyl Formate(CAS No. 107-31-3) 아만성 흡입독성시험	7
<표 4> 흡입독성자료를 활용한 희토류 물질의 인체 무영향 도출 연구의 군구성	8
<표 5> 실험동물을 이용한 나노 란탄산화물(La ₂ O ₃)의 흡입독성 연구의 군구성 ...	9
<표 6> 화학물질 노출에 의한 유전자돌연변이(발암)의 조기 확인(II)의 군구성 ..	10

그림 차례

[그림 1] 주사전자현미경과 투과전자현미경	3
[그림 2] 탈수 과정	12
[그림 3] 함수 과정	13
[그림 4] 염색 과정	14
[그림 5] 탈수 및 투명화 과정	14
[그림 6] HE 슬라이드 제작 과정 요약	15
[그림 7] 고정 절차	16
[그림 8] SEM 탈수 과정	17
[그림 9] SEM 치환 과정	17
[그림 10] SEM 시료처리 과정 요약	19
[그림 11] TEM 탈수 절차	21
[그림 12] TEM 치환 및 침투 절차	21
[그림 13] TEM 시료처리 과정 요약	24
[그림 14A] 랫드를 이용한 Calcium Sulfate의 급성흡입독성시험의 비강 사진 ...	25
[그림 14B] 랫드를 이용한 Calcium Sulfate의 급성흡입독성시험의 비강 사진 ...	26
[그림 14C] 랫드를 이용한 Calcium Sulfate의 급성흡입독성시험의 비강 사진 ...	26
[그림 15A] 랫드를 이용한 Calcium Sulfate의 급성흡입독성시험의 비강 사진 ...	27
[그림 15B] 랫드를 이용한 Calcium Sulfate의 급성흡입독성시험의 비강 사진 ...	28
[그림 15C] 랫드를 이용한 Calcium Sulfate의 급성흡입독성시험의 비강 사진 ...	28
[그림 16A] 랫드를 이용한 Methyl Formate의 아만성 흡입독성시험의 비강 사진	29

[그림 16B] 랫드를 이용한 Methyl Formate의 아만성 흡입독성시험의 비강 사진	30
[그림 16C] 랫드를 이용한 Methyl Formate의 아만성 흡입독성시험의 비강 사진	30
[그림 17A] 랫드를 이용한 Methyl Formate의 아만성 흡입독성시험의 비강사진	31
[그림 17B] 랫드를 이용한 Methyl Formate의 아만성 흡입독성시험의 비강사진	32
[그림 17C] 랫드를 이용한 Methyl Formate의 아만성 흡입독성시험의 비강사진	32
[그림 18A] 흡입 독성자료를 활용한 희토류 물질의 인체 무영향 도출연구의 랫드 폐 사진	33
[그림 18B] 흡입 독성자료를 활용한 희토류 물질의 인체 무영향 도출연구의 랫드 폐 사진	34
[그림 18C] 흡입 독성자료를 활용한 희토류 물질의 인체 무영향 도출연구의 랫드 폐 사진	34
[그림 19A] 흡입 독성자료를 활용한 희토류 물질의 인체 무영향 도출연구의 랫드 폐 사진	35
[그림 19B] 흡입 독성자료를 활용한 희토류 물질의 인체 무영향 도출연구의 랫드 폐 사진	36
[그림 20A] 실험동물을 이용한 나노 란탄산화물(La ₂ O ₃)의 흡입독성 연구의 랫드 폐 사진	37
[그림 20B] 실험동물을 이용한 나노 란탄산화물(La ₂ O ₃)의 흡입독성 연구의 랫드 폐 사진	38
[그림 20C] 실험동물을 이용한 나노 란탄산화물(La ₂ O ₃)의 흡입독성 연구의 랫드 폐 사진	38

[그림 20D] 실험동물을 이용한 나노 란탄산화물(La_2O_3)의 흡입독성 연구의 랫드 폐 사진	39
[그림 20E] 실험동물을 이용한 나노 란탄산화물(La_2O_3)의 흡입독성 연구의 랫드 폐 사진	39
[그림 21A] 실험동물을 이용한 나노 란탄산화물(La_2O_3)의 흡입독성 연구의 랫드 폐 사진	40
[그림 21B] 실험동물을 이용한 나노 란탄산화물(La_2O_3)의 흡입독성 연구의 랫드 폐 사진	41
[그림 22A] 화학물질 노출에 의한 유전돌연변이(발암)의 조기 확인(II)(실험동물을 이용한 고감도 발암성 확인기법의 검증)의 마우스 폐 사진	42
[그림 22B] 화학물질 노출에 의한 유전돌연변이(발암)의 조기 확인(II)(실험동물을 이용한 고감도 발암성 확인기법의 검증)의 마우스 폐 사진	43
[그림 22C] 화학물질 노출에 의한 유전돌연변이(발암)의 조기 확인(II)(실험동물을 이용한 고감도 발암성 확인기법의 검증)의 마우스 폐 사진	43
[그림 23A] 화학물질 노출에 의한 유전돌연변이(발암)의 조기 확인(II)(실험동물을 이용한 고감도 발암성 확인기법의 검증)의 마우스 폐 사진	44
[그림 23B] 화학물질 노출에 의한 유전돌연변이(발암)의 조기 확인(II)(실험동물을 이용한 고감도 발암성 확인기법의 검증)의 마우스 폐 사진	45

약 어 설 명 표

약 어	설 명
CAS (Chemical Abstract Service)	화학물질 요약 서비스
GLP (Good Laboratory Practice)	우수실험시설 운영기준
HE (Hematoxylin and Eosin)	헤마톡실린 및 에오신 염색
SEM (Scanning Electron Microscope)	주사전자현미경
TEM (Transmission Electron Microscope)	투과전자현미경
TWA (Time Weighted Average)	시간가중 평균노출기준

I. 서 론

1. 연구 배경

1) 연구 필요성

작업장에서 화학물질이 노출되면 1차적으로 호흡기계에 영향을 일으킨다. 호흡기계 손상성 화학물질 예로 포스진, 산화 카드뮴, 암모니아 등을 들 수 있다. 포스진은 살충제, 플라스틱 제조에 사용되는 물질로 급성으로 부종을 만성으로는 기관지염, 섬유증을 유발하고, 산화카드뮴은 용접, 전자기구 제조, 합금, 제련등에 사용되는 물질로 급성으로 기침 폐렴, 만성으로는 폐기종, 폐성심을 발생, 암모니아는, 비료제조, 화학물질제조, 폭발물 제조 등에 사용되는 데 급성으로 상부 및 하부 호흡기계 자극 만성으로 기관지염을 유발한다. 이 외에도 수많은 화학물질이 호흡기계에 손상 및 자극을 줄 수 있으며, 특히 배기시설이 취약한 작업장 환경에서는 근로자에게 큰 피해를 입힐 수 있다.

호흡기계 손상성 화학물질을 확인하기 위한 고감도 진단 기법은 독성시험에서 필수이다. 전자현미경은 배율이 최대 100만 배까지 확대가 가능하여 고감도 장비로 미토콘드리아, 조면소포체, 골지체, 핵의 크로마틴 등 세포 미세소기관 변화와 시험물질의 분포, 미세한 세포 표면 변화 등을 관찰 할 수 있어, 화학물질 독성 기전에 대한 세부 정보를 제공 할 수 있다. 따라서, 본 연구는 독성시험에서 전자현미경을 이용하여 화학물질에 의한 호흡기계 손상 지표를 확인하고자한다.

2) 전자현미경 개요

(1) 전자현미경의 정의

전자현미경을 전자선과 전자 렌즈를 이용하여 물체의 확대 상을 만드는 현미경이다. 전자현미경은 광선 대신에 전자 빔을 사용하는데 현미경의 내부는 진공상태인데 전자가 공기와 충돌하여 에너지가 소실하거나 굴절되어 원하는 대로 제어가 어렵기 때문이다. 표본과 대물렌즈와 렌즈 간의 거리는 일정하게 유지하지만 중간렌즈와 투영렌즈의 코일에 흐르는 전류의 세기에 의해 배율이 정해지며, 상의 초점 또한 대물렌즈의 코일에 흐르는 전류에 의해 정해진다. 전자현미경은 사진판이나 형광판을 통해 상을 관찰할 수 있는데, 전자선이 시료의 표면에 충돌하면서 발생하는 산란전자, 이차전차, 투과전자, X-Ray 등을 감지하여 표면의 형태를 영상으로 나타낸다.

(2) 전자현미경의 종류

전자현미경은 투과전자현미경과 주사전자현미경으로 크게 두 종류로 분류된다. 투과전자현미경은 세포의 내부구조를 관찰하기 위하여 얇게 잘라 만든 시료의 단면을 전자로 투과하여 형광판에 상을 만들고, 주사전자현미경은 시료 표면에 전자를 주사하여 반사하여 감지한 전자로 입체적으로 상을 얻는다.

가) 투과 전자현미경(Transmission Electron Microscope)

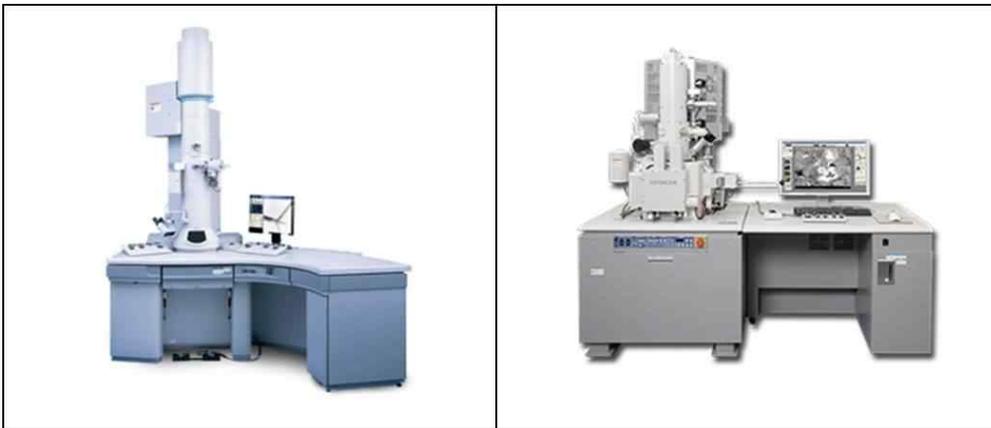
투과전자현미경은 높은 진공 상태에서 고속으로 가속된 전자선을 이용하여, 전자선이 표본을 투과하면서 전기자기장 또는 정전기장을 통하여 형광판에 초점을 맞추어 투사된다.

투과전자현미경은 해상력과 확대율이 우수하여 광학현미경으로 관찰할 수 없는 세포의 미세한 구조를 관찰할 수 있다. 이는 얇은 시료(60nm정도)를 광선(Beam)이 투과하여 관찰을 해서 2차적인 단면적인 상을 얻을 수 있다.

나) 주사 전자현미경(Scanning Electron Microscope)

주사전자현미경은 가속된 전자를 표본 위에 주사시켜 반사되는 2차 전자를 증폭 관찰함으로써 상을 관찰할 수 있는 것이 특징이다. 즉, 표본의 미세구조를 3차원 입체구조로 관찰할 수 있다. 시료의 제작과정도 주사 전자현미경에 비하여 간편하며 시료에 따라서는 간편한 물리적 조작으로 생체시료를 관찰할 수 있다.

주사전자현미경은 초점이 잘 맞추어진 전자선을 시료의 표면에 주사하면, 주사된 전자선이 시료의 한 점에 집중되면서 1차 전자는 굴절되고 표면에서 반사되는 2차 전자는 전자검출기(Detector)에 감지된다. 그 결과 생긴 신호들이 여러 점으로부터 모여들어 음극선관에 상을 얻는데, 주사전자현미경은 시료 위에 주사된 전자들을 수집하여 3차원적인 이미지를 얻는다.



[그림 1] 투과전자현미경과 주사전자현미경<출처: www.hitachi-hightech.com>

<표 1> 투과전자현미경과 주사전자현미경 비교

	투과전자현미경	주사전자현미경
전자선	시료 투과	시료 표면에 주사
구조 관찰	단면구조	외부구조
상의 관찰	2차원적 단면이미지	3차원적 입체이미지

3) 선행연구

2000년도 초반 미국의 팝콘제조공장에서 팝콘에 첨가되는 인공 버터향 화합물인 Diacetyl을 증기 형태로 흡입한 근로자들에게 기관지 폐색증이 유발 사례가 확인되었다. 랫드에서 TWA 365 ppm 기준으로 재현한 실험 결과, 비강, 후두, 기관지등에서 상피괴사와 화농성, 섬유소성 염증이 유발이 되었다. 전자현미경 상에서는 조면소포체 팽창 및 말립, 크로마친 응집, 공포화, 기저막 탈락, 세포사이 공간 확장 등의 소견이 관찰되었다(Hubbs et al, 2008). 또한, nano-TiO₂ 기도 투여한 마우스 폐의 광학현미경 관찰에서 nano-TiO₂ 투여군에서 염증세포 침윤, 폐중격 비후, 부종이 용량 의존적으로 증가하였으며, 특히 10 mg/kg 투여군에서는 나노물질로 추정되는 검은 응집체가 관찰되었다. 전자현미경 관찰에서는 광학현미경에서는 관찰되지 않은 폐포세포의 미토콘드리아 종창, 핵응축, 크로마친 응집 등 세포자멸사 소견이 관찰되었다. 10 mg/kg 투여군에서도 전자현미경 상에서 검은 응집체가 관찰되었다(Bing Li et al, 2013).

이와 유사한 시험으로 나노 사이즈의 카드뮴 산화물(Cadium Oxide)를 2.96×10^6 particles/cm³를 ICR 마우스에 노출한 시험에서는 폐에서 충혈, 중격 확장, 모세 혈관 충혈 및 무기폐 등이 확장되었으며, 전자현미경에서 시험물질인 나노입자가 기관지 세포, 폐포세포, 세포질, 대식세포의 세포에서 관찰되고, 미토콘드리아 및 세포질 소포에서도 관찰되었다(Dumkova J et al, 2016).

Styrene의 전신흡입노출시험에서 160 ppm을 1회 투여한 마우스에서 큰기관지, 중간기관지, 종말세기관지에서 상피 탈락이 광학 현미경에서 관찰되었다. 160 ppm을 5회와 20회 투여한 마우스의 큰기관지, 중간기관지의 클라라 세포(clara cell)에서 세포종창, 수포와 분비과립의 감소가 관찰되었다. 전자현미경 상에서 큰기관지, 중간기관지의 클라라세포를 관찰한 결과 공포성 세포 변성, 세포 괴사 등 세포변성 소견 또는 전자 밀도, 타원형 과립손실 등 미세한 세포변화가 관찰되어 Styrene의 표적세포(Target cell)가 클라라세포인 것을 확인할 수 있었다(Gamer A.O et al, 2004).

2. 연구 목표

본 연구에서는 생물시료의 전자현미경 검체 제작 및 관독 기법 확립을 하고 이를 바탕으로 독성시험에서 광학 현미경과 전자현미경을 이용하여 호흡기계 조직 손상 지표를 비교 확인 및 고찰하고자 한다.

II. 연구 방법

1. 대상 시험

본 과제에 사용된 시료는 화학물질독성연구실에서 2016년까지 수행한 GLP 시험 및 연구과제의 고정조직 중에서 비강 또는 폐 등에서 호흡기계 손상 소견이 확인된 시험의 호흡기계 조직을 선별하여 광학 현미경 검체제작, 주사전자현미경 검체제작 또는 투과전자현미경 검체제작을 하여 관찰 비교하였다. 대상 시험명, 시험물질, 동물종 투여경로, 투여시간 및 기간, 군구성, 일반증상 및 육안소견을 요약한 사항은 다음과 같다.

1) 시험명: 랫드를 이용한 Calcium Sulfate(CAS No. 10034-76-1)의 급성 흡입독성시험

- (1) 시험물질: Calcium Sulfate
- (2) 동물 종: Sprague- Dawley(SD) rat
- (3) 투여경로: 비부흡입노출
- (4) 투여시간 및 기간: 4시간 단회노출, 14일간
- (5) 군구성

<표 2> 랫드를 이용한 Calcium Sulfate(CAS No. 10034-76-1)의 급성흡입독성시험의 군구성

시험물질	군	농도 (mg/L)	성별	수	동물번호
Calcium Sulfate	G1	0.5	M	5	1101-1105
			F	5	2101-2105
	G2	1.0	M	5	1201-1205
			F	5	2201-2205
	G3	5.0	M	5	1301-1305
			F	5	2301-2305

M; Male, F; Female

(6) 일반증상 및 육안소견: 이상소견 없음

2) 랫드를 이용한 Methyl Formate(CAS No. 107-31-3) 아만성 흡입독성시험

- (1) 시험물질: Methyl Formate
- (2) 동물 종: Sprague- Dawley(SD) rat
- (3) 투여경로: 전신흡입노출
- (4) 투여시간 및 기간: 1일 6시간, 주5일 90일간
- (5) 군구성

<표 3> 랫드를 이용한 Methyl Formate(CAS No. 107-31-3) 아만성 흡입독성시험

시험물질	군	농도(ppm)	성별	수	동물번호
Methyl Formate	G1	0	M	10	1001-1110
			F	10	2001-2010
	G2	100	M	10	1101-1110
			F	10	2101-2110
	G3	400	M	10	1201-1210
			F	10	2201-2210
	G4	1,000	M	10	1301-1310
			F	10	2301-2310

M: Male, F; Female

(6) 일반증상 및 육안소견: 일반증상 이상소견 없음, 폐에서 발적이 관찰되었으나 조직학적으로 특이소견 없음

3) 흡입독성자료를 활용한 희토류 물질의 인체 무영향 도출 연구

- (1) 시험물질: 나노 네오디움 산화물

- (2) 동물 종: Sprague- Dawley(SD) rat(수컷)
- (3) 투여경로: 비부노출
- (4) 투여시간 및 기간: 1일 6시간, 28일 반복노출 및 28일 회복
- (5) 군구성

<표 4> 흡입독성자료를 활용한 희토류 물질의 인체 무영향 도출 연구의 군구성

시험물질	군	농도(mg/m ³)	구분	수	동물번호
Neodymium(III) Oxide	G1	0	주시험	8	1-8
			회복	8	9-16
	G2	0.5	주시험	8	17-24
			회복	8	25-32
	G3	2.5	주시험	8	33-40
			회복	7	42-48
	G4	10	주시험	8	49-56
			회복	8	57-64

M: Male, F: Female

- (6) 일반증상 및 육안소견: 일반증상 이상소견 없음, 시험군 폐에서 적색 변색이 관찰됨
- 4) 실험동물을 이용한 나노 란탄산화물(La₂O₃)의 흡입독성 연구
- (1) 시험물질: 나노 산화란탄 산화물
 - (2) 동물 종: Sprague- Dawley(SD) rat(수컷)
 - (3) 투여경로: 비부노출
 - (4) 투여시간 및 기간: 1일 6시간, 28일 반복노출 및 28일 회복
 - (5) 군구성

<표 5> 실험동물을 이용한 나노 란탄산화물(La₂O₃)의 흡입독성 연구의 군구성

시험물질	군	농도 (mg/m ³)	구분	수	동물번호
Lanthanum(III) Oxide	G1	0	주시험	8	1001-1008
			회복	7	1101-1007
	G2	0.5	주시험	8	1201-1208
			회복	8	1301-1308
	G3	2.5	주시험	8	1401-1408
			회복	8	1501-1508
	G4	10	주시험	7	1601-1607
			회복	8	1707-1708

M: Male, F; Female

(6) 일반증상 및 육안소견: 일반증상 이상소견 없음, 시험군 폐에서
흰색반점등이 산발적으로 관찰됨

5) 화학물질 노출에 의한 유전자돌연변이(발암)의 조기 확인(II)

– 실험동물을 이용한 고감도 발암성 확인기법의 검증

(1) 시험물질: 우레탄

(2) 동물 종: Slc ICR 마우스 (수컷)

(3) 투여경로: 복강투여

(4) 투여시간 및 기간: 단회 투여, 2주, 6주, 11주차 부검

(5) 군구성

<표 6> 화학물질 노출에 의한 유전자돌연변이(발암)의 조기 확인(II)의 군구성

시험물질	주차	농도 (mg/g)	군	수	동물번호
Urethane	2	1	대조군	2	1003-1004
			투여군	6	1101-1106
	6	1	대조군	2	1002, 1005
			투여군	6	1201-1206
	11	1	대조군	2	1001, 1006
			투여군	6	1301-1306

(6) 일반증상 및 육안소견: 일반증상 이상소견 없음, 투여 후 6주부터 시험군 폐에서 백색 결절이 관찰됨

2. 광학현미경 검체제작 절차

광학현미경 상에서 생체조직을 관찰하기위해 하는 일반적으로 HE슬라이드를 제작하여 관찰한다. HE염색에서는 핵은 염기성 염료인 헤마톡실린 (Hematoxylin)으로 청자색으로 세포질은 산성염료인 에오신(Eosin)으로 분홍내지 적색으로 염색을 하여 관찰한다. 검체제작 과정은 절차는 다음과 같다.

1) 시료의 채취 및 세절

시험동물에서 적출한 조직을 비강은 후두를 통해서, 폐는 기관을 통해서 10% 중성 완충 포르말린을 관류 고정을 실시한다.

2) 고정(Fixation)

산소 공급이 중단되면 세포 내에서는 가수분해효소(Hydrolytic Enzyme)가

세포내 소기관들을 분해하여 세포의 구조가 모두 파괴되는 사후변화가 진행된다. 따라서 고정은 세포의 사후변화를 중지시키고, 단백질 등 특정 조직성분을 응고 또는 침전시켜 조직학적 검사에 적합한 상태로 만든다.

- (1) 고정액의 양 : 조직 용적의 10~20배 (일반적으로 고정액 양을 20배로 하는 것이 권장)
- (2) 고정시간 : 조직의 크기나 성질, 고정액의 온도, 고정제의 종류에 따라 다르지만, 실온 내지 저온(2~4°C)에서 고정시간은 4~6시간이다(실온에서는 거의 하루 정도 방치한다).
- (3) 고정온도 : 검사재료는 실온(18~20°C), 조직 내 효소를 확인 시에는 2~4°C(생체와 거의 유사한 조건을 나타내기 위해)

3) 수세(Washing)

고정 완료 후 조직 내에 남아 있는 고정액은 조직 검체 제작과정을 방해하고, 인공산물(Artifact)를 만들기 때문에 이를 제거하기 위해서는 흐르는 수돗물에 충분히 수세를 해야만 한다. 수세 시간은 교과서적으로 12~24시간이나, 일반적으로 2~4시간 실시한다.

4) 탈수(Dehydration)

조직 내에 파라핀(Paraffin)을 침투시키기 위해선 조직 수분을 제거하는 과정이다. 급격한 수축을 방지하기 위하여 조직의 수분 농도와 유사하게 알코올의 농도를 천천히 높이면서 탈수를 진행한다. 탈수, 투명, 침투과정은 장시간이 걸리므로 일반적으로 자동조직처리를 이용한다.



[그림 2] 탈수 과정

5) 투명화(Clearing)

알코올을 제거해 주며, 침투제인 파라핀과 잘 혼합되게 만드는 과정으로, 일반적으로 자일렌(Xylene)을 사용하나, 인체 유해성의 문제로 이와 유사한 성분의 대체제가 많이 이용되고 있다. 대부분 투명제들은 유기용매로써 조직세포와 비슷한 굴절률을 가지므로 과정 처리 후에 조직이 투명하게 보이는 성질이 있다. 자일렌을 30분씩 3회 처리한다. 일반적으로 자동조직처리기를 이용한다.

6) 침투(Infiltration)

침투과정은 조직 간극이나 세포 사이 공간에 조직에 적당한 강도를 부여하기 위하여 조직내에 침투제를 채우는 과정이다. 60℃의 액체 파라핀이 조직에 잘 침투하도록 진공상태에서, 약 1시간씩 3회 정도 처리한다. 일반적으로 자동조직처리기를 이용한다.

7) 포매(Embedding)

병소 부위 박절하기 위해 파라핀 블록을 제작하는 과정이다. 포매기에서 몰드(Mold)에 박절하기 원하는 부위가 바닥을 향하게 심은 다음, 파라핀을 몰드에 분주하고 -5℃ 냉각판에 놓고 천천히 냉각한다(급속한 냉각은 블록 표면에 금(crack)을 발생시킨다).

8) 박절(Sectioning)

박절기(Microtome)을 이용하여 파라핀 블록에서 원하는 조직이나 병소가 포함된 절편을 3~4 μ m 두께로 박절한다. 40~45 $^{\circ}$ C 가온수조에 절편을 띄운 다음 파라핀절편의 주름을 피고, 슬라이드 글라스에 붙인 다음, 슬라이드 건조기에서 건조한다.

9) 탈파라핀(Deparaffinization)

건조된 슬라이드글라스를 오븐에서 60 $^{\circ}$ C에서 파라핀으로 녹인 다음, 냉각시킨 후 자일렌을 2회 씩 약 5분 정도 처리한다.

10) 함수(Hydration)

세포를 원래 상태 가깝게 만들기 위해 함수를 진행한다. 일반적으로 자동염색기를 이용한다.



[그림 3] 함수 과정

11) 염색(Staining)

핵은 염기성 염료인 헤마톡실린으로 청자색으로 세포질은 산성염료인 에오신으로 분홍내지 적색으로 염색을 한다. 헤마톡실린은 Mayer와 Harris를 많이 이용하는데 전자는 진행성 염색이고 후자는 퇴행성 염색으로 퇴행성 염색은 염산(HCL)로 헤마톡실린을 탈색한 후 암모니아(Ammonia)로 중화시키는

과정이 필요하다. 일반적으로 자동염색기를 이용한다.



[그림 4] 염색 과정

12) 탈수(Dehydration) 및 투명화(Clearing)

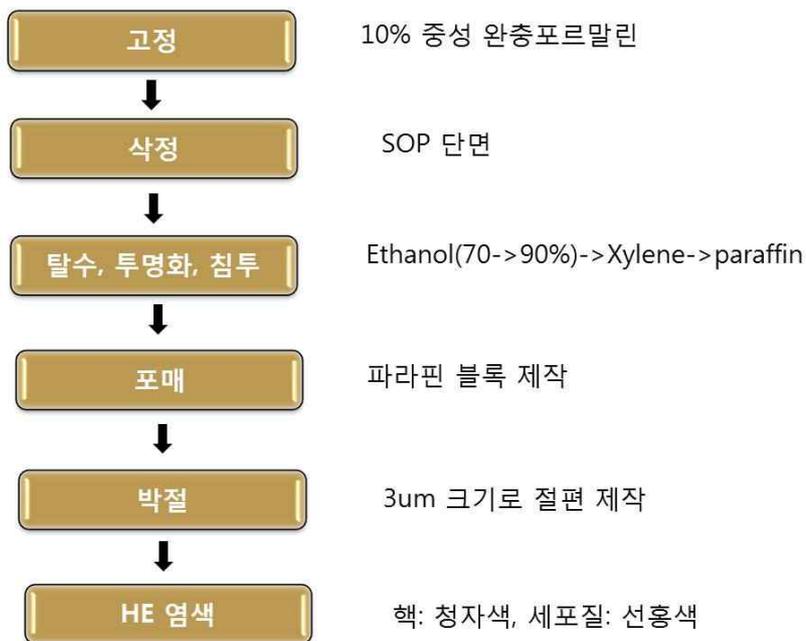
염색 후 탈수는 수분이 조직 내에 남아 있으면, 조직이 수축을 하므로 이를 방지하기 위함이다. 투명화는 탈수제로 이용한 알코올을 조직 내에서 제거하기 위한 과정이다. 일반적으로 자동염색기를 이용한다.



[그림 5] 탈수 및 투명화 과정

13) 봉입(Mounting)

캐나다 발삼(Candian Balsam) 등 봉입제를 이용하여 커버슬립(Coverslip)을 조직 위에 덮고 건조한다.



[그림 6] HE 슬라이드 제작 과정 요약

3. 주사전자현미경 검체 제작 절차

1) 시료의 채취 및 세절(Sampling and Cutting)

관찰하고자 하는 표면적은 넓게하고, 두께는 얇게 시료를 채취하는 것이 좋다(특히, 소장 또는 조직의 표면을 관찰할 경우). 조직을 세절할 경우 약간 길게 1×1×4 mm 정도로 자른다. 고정 전에 pH7.2~7.4 정도의 Buffer 또는 Saline을 이용하여 시료 표면의 이물질을 반드시 제거하여야 한다. 특히, 장 경우에는 반드시 필요하다. 그리고 가능한 실험동물이 마취한 상태에서 필요한 조직을 채취한다.

2) 고정(Fixation) 및 수세(Washing)

(1) 고정의 목적

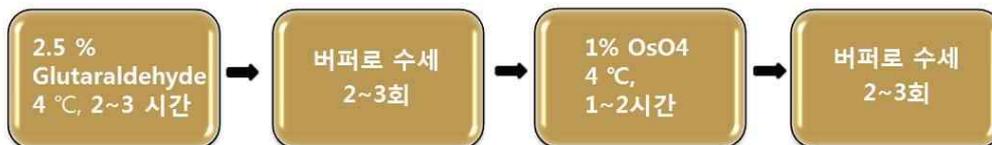
세포의 자가용해와 구성 성분의 응고를 방지하여 세포의 구조의 변화를 최소화하기 위하여 고정을 실시한다. 전자현미경의 고정은 Aldehyde 계열을 이용하여 고정하는 전고정과 1% OsO₄ 후고정을 실시한다.

(2) 고정액 (fixative)의 선택

가) 일반적으로 전고정에는 Aldehyde 계통인 2.5% 정도의 파라포름알데하이드(Paraformaldehyde)고정액과 2.5%의 글루타르알데하이드(Glutaraldehyde)를 많이 사용한다. 이들 고정액은 조직내 침투를 빨리 하여 조직의 수축 또는 팽창 등의 변화를 최소화시킨다.

나) 투과전자현미경의 조직 고정에는 글루타르알데하이드 단독으로 사용하거나 파라포름알데하이드와 혼합 용액인 Karnovsky's 고정액이 많이 사용되나, 주사전자현미경을 위한 조직 고정시는 글루타르알데하이드만을 사용하는 경향이 있다.

다) 후고정은 중금속인 1% OsO₄를 이용하여 전자밀도(Contrast)를 증가시킨다.



[그림 7] 고정 절차

(3) 완충액 (Buffer)의 사용

고정액의 pH와 삼투압을 조절을 위하여 완충액을 사용한다. (pH 7.2~7.4)

Phosphate나 Cacodylate buffer가 많이 사용된다. 고정액들 간의 반응을 방지하기 위하여 같은 성분의 버퍼로 고정 사이에 세척을 한다.

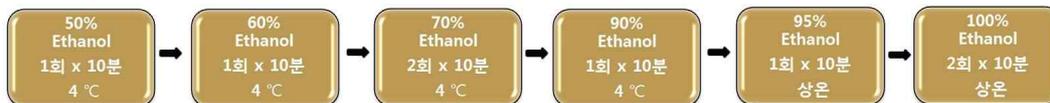
3) 탈수(Dehydration)

(1) 목적

임계건조 시 사용되는 액체 이산화탄소와 프레온은 수분과 완전히 섞이지 않기 때문에 제거하여야 한다. 건조할 때 생물시료 중 수분이 남아 있으면 물의 표면 장력으로 인해 조직변형이 발생한다.

(2) 탈수방법 및 시간

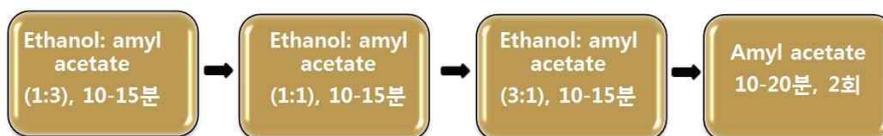
조직의 성질과 크기 등에 따라서 탈수 시간을 조절할 수 있으나, 탈수 시간이 너무 길면 조직으로부터 조직이 수축하고, 세포 구성성분의 유출이 발생할 수 있다.



[그림 8] SEM 탈수 과정

4) 치환(Substitution)

세포 안에 있는 에탄올을 아밀아세테이트(Amyl Acetate)로 치환한다.



[그림 9] SEM 치환 과정

5) 임계 건조(Critical Point Drying)

(1) 목적

탈수 후 시료에 남아 있는 탈수용액을 완전히 제거하기 위하여 실시한다. 건조가 불완전할 경우 진공 중에서 시료가 수축되어 이온 코팅(Ion Coating)이 원활히 실시되지 않는다.

(2) 방법

공기 건조, 냉풍건조, 초임계건조 등이 있으며, 통상 일반적인 조직은 초임계 건조 방법을 많이 사용한다. 배양시료와 같이 Petri Dish 채로 건조하는 경우는 TMS(tetramethyl-silane) 또는 HMDS(Hexamethyl-Disilazane) 등의 시약을 이용한다.

6) 부착(Mounting)

건조가 완료된 시료는 양면 테이프, 목공용 본드, Silver Paste 를 이용하여 시료대(Stub)에 부착한다. 관찰시 전하 증가(Charge-Up) 현상이 발생하기 때문에 윗부분을 아래부분 보다 넓게 시료를 트리밍해서 부착시킨다.

7) 이온 증착(Coating)

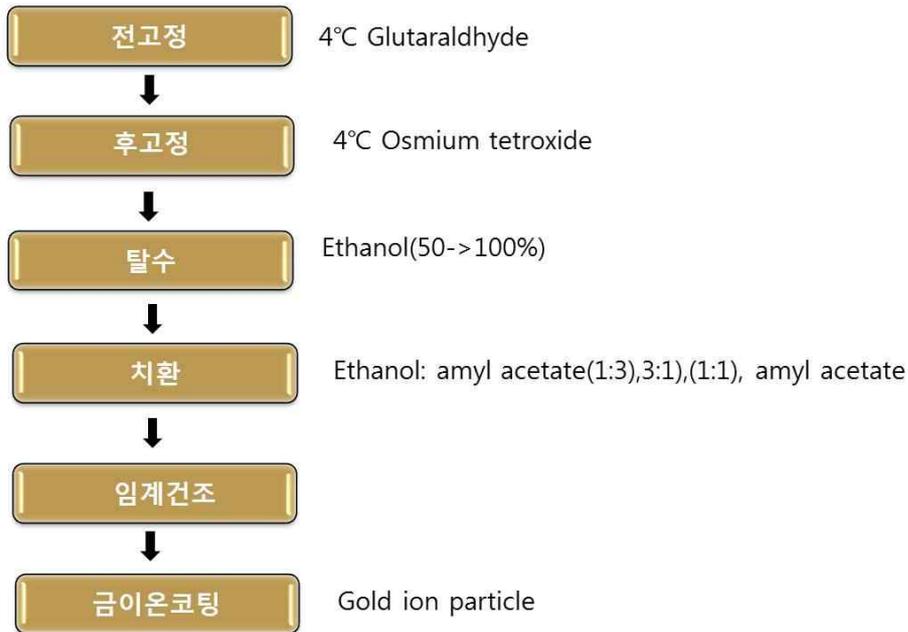
(1) 목적

비전도성 시료의 도체화, 전자선 손상의 경감, 2차 전자 방출증가를 위해 실시한다.

(2) 방법

일반적으로 이온 코팅기(Ion Coater)를 이용하여 0.05 torr정도로 배기된 챔버 안에서 코팅을 한다. 코팅이온은 Au, Au-Pd, Pt, Pt-Pd 등의 금속을

이용하는데, 주로 금이온(Au)이 이용되며, 100 - 200 Å 정도의 두께로 코팅을 실시한다.



[그림 10] SEM 시료처리 과정 요약

4. 투과전자현미경 검체제작 절차

1) 시료의 채취 및 세절

전자현미경의 고정액인 글루타르알데하이드는 조직 내 침투 내의 속도가 느리게 때문에 고정에 앞서 조직의 세절이 반드시 필요하다. 세절작업은 절차는 아래와 같다.

- (1) 코르크 판위에서 각각 반대 방향으로 잡아 당기면서 1mm³ 이하로 작게 세절한다.

- (2) 고정액을 얼음으로 채운 Petri Dish 내에서 냉각하고, 고정액을 시료 위에 떨어 뜨려 건조를 방지한다.
- (3) 피부나 신경 등 방향성이 요구되는 조직은 1×1×2 mm 정도로 한쪽 방향을 길해야 포매가 용이하다
- (4) 조직을 채취하는데 시간이 지연되거나, 고정이 잘 되지 않는 조직은 관류(Perfusion) 또는 침지(Immersion) 고정한 후 채취한다.
- (5) 가능한 실험동물이 마취한 상태에서 필요한 조직을 채취한다.
- (6) 1~2분 내로 신속히 고정액에 담아야 한다.

2) 고정(Fixation)

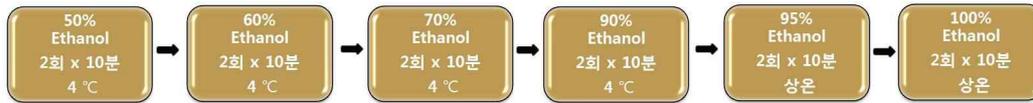
고정액 사용과 절차는 주사전자현미경과 동일하므로 주사전자현미경의 고정 부분을 참조한다.

3) 탈수(Dehydration)

조직의 성질과 크기 등에 따라서 탈수 시간이 달라지나 가능한 짧은 시간내에 실시한다. 탈수시간이 너무 길면 조직으로부터 물질의 유출과 조직의 수축이 일어 날수 있다. 탈수시간이 너무 짧으면, 탈수가 불완전하여, 포매과정에서 조직 제작 시 많은 어려움이 발생하게 된다. 탈수제로는 아세톤(Acetone)과 알코올(Ethanol)이 주로 이용되며, 아세톤을 사용하면 지질 보존효과가 우수하고, 포매제인 에폭시 수지(Epoxy resin)와 혼합이 잘되어 치환제가 불필요하지만 흡습성이 강하여 조직이 수축되기 쉽고, 탈수가 불완전할 우려가 있다. 반면,

에탄올은 에폭시 수지와 잘 섞이지 않으므로 치환제로서 QY-1(N-butyl Glycidyl Ether)와 프로필렌 옥사이드(Propylene Oxide)를 사용하는 편이 좋지만, 탈수능력이 우수하여 주로 에탄올을 이용하고 있다.

탈수는 아래 그림과 같이 진행된다.

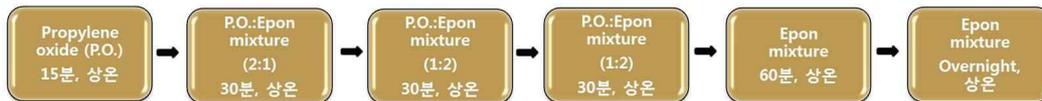


[그림 11] TEM 탈수 절차

4) 치환 (Substitution) 및 침투(Infiltration)

포매 수지가 조직 내에 잘 침투하도록 프로필렌옥사이드가 중간제 역할을 한다. 모든 과정은 교반을 시켜주어야 한다.

치환 및 침투는 아래 그림과 같이 진행된다.



[그림 12] TEM 치환 및 침투 절차

5) 포매

상품화 된 Epon 812 포매제에 경화제인 NMA(Nadic Methyl Anhydride), DDSA(Dodecenyl Succinic Anhydride)와 경화 가속제로 DMP-30 (Tridimethyl Phenol)를 일정 용량비율로 첨가하여 완전히 혼합한다. NMA의 용량이 DDSA의 용량에 비해서 비율이 높으면 블록(Block)은 단단해 지고, 반대로 NMA가 적고, DDSA가 비율이 높으면 블록이 연해진다. 따라서, 공기중의 습도 등 실험조건에

따라 혼합비율을 조정할 필요가 있다. 진탕기(Magnetic Stirrer) 또는 유리봉을 이용하여 혼합액을 20~30분간 충분히 섞어준다. 혼합 과정에서 발생하는 기포는 진공건조기(Vacuum Desiccator)를 이용하여 완전히 기포를 제거한다. 사용하지 않을 경우는 완전히 밀봉하여 냉동 또는 냉장온도로 보관해서 사용하나 최대한 당일 제조해서 사용하는 것이 좋다. 그런다음 38℃ 12시간, 45℃ 12시간, 60℃ 24시간동안 오븐에서 경화를 시킨다.

가) 용량에 의한 조제법

- A액 : Epon 812 (포매제)	62ml
- B액 : Epon 812	100ml
DDSA(연성 경화제)	100ml
NMA (경성경화제)	89ml
DMP-30(중합 촉진제)	1.5%

6) 트리밍(Trimming)

블록에서 불필요한 부분을 제거하며 절편이 연속적으로 박절이 잘 되도록 사다리꼴 모양을 만들어 준다. 해부현미경 하에서 면도칼을 사용하여 해당되는 시료만 포함되도록 작게 블록을 트리밍한다.

7) 준초박절(Semithin)

가) 초박절편기를 이용하여 절편을 0.5~2 μm 두께로 자른다.

나) 수면 위에 절편을 Loop나 Eyelash로 건져서 슬라이드글라스에 옮긴다.

다) 절편에 붙은 슬라이드 글라스를 Hot Plate에서 가열하여 건조한다.

라) 절편 위에 Toluidine Blue나 Methylene Blue로 염색액을 한 방울을 떨어 뜨려 Hot Plate로 가열하여 건조한다.

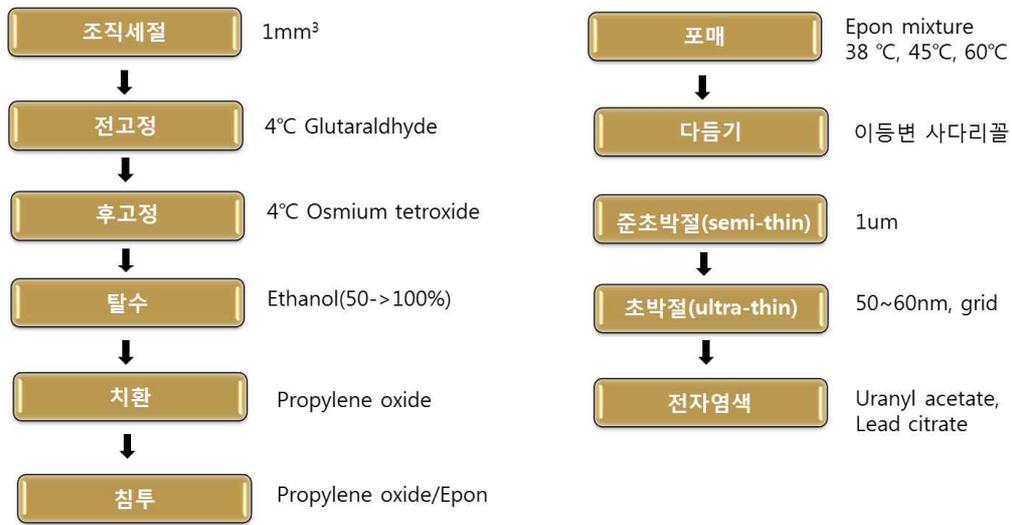
마) 염색이 되도록 적절히 세척한 후 광학현미경으로 관찰한다.

8) 초박절(Thin Section)

- 가) 광학현미경으로 절편을 관찰한 후 필요한 부분만이 남도록 블록을 재트리밍한다.
- 나) 조동나사와 미동나사를 조절하여 블록을 칼날에 접근시 수동으로 상하운동을 하여 절편을 만든다.
- 다) 시료표면이 전체가 잘리면 박절기를 자동모드로 전환하고 절편에 반사되는 빛깔로 두께를 확인하여 알맞은 두께(70~80 nm)가 되도록 박절한다.
- 라) 일정한 두께의 절편이 연속적으로 리본 모양으로 생산 되면 이를 그리드(Grid)로 뜬다.

9) 염색

- 가) Petri Dish에 파라핀 필름(Paraffin Film)을 깔고 Uranly Acetate 염색액을 한 방울 떨어뜨린 후 그리드를 절편이 있는 면으로 부유시켜 15~30분간 염색한다.
- 나) 염색이 완료된 그리드는 증류수를 담은 비커에 40~50회 수세한다. 이때 그리드를 놓치지 않도록 주의한다.
- 다) 여과지에 그리드의 물기를 흡수시켜 건조시킨다.
- 라) 위와 동일한 방법으로 Lead Citrate로 그리드를 5~10분간 염색하고 수세, 건조한다.



[그림 13] TEM 시료처리 과정 요약

4. 광학현미경과 전자현미경 상에서 호흡기계 조직 손상 관찰 및 손상 지표 고찰

대상시험의 시료에서 광학현미경 상에서 관찰한 호흡기계 조직 손상 지표와 주사 또는 투과전자현미경상에서 호흡기계 조직 손상 지표를 다양한 배율에서 관찰비교하고 이에 대해 고찰한다.

III. 연구 결과

1. 광학현미경과 전자현미경 상에 호흡기계 조직 손상 관찰

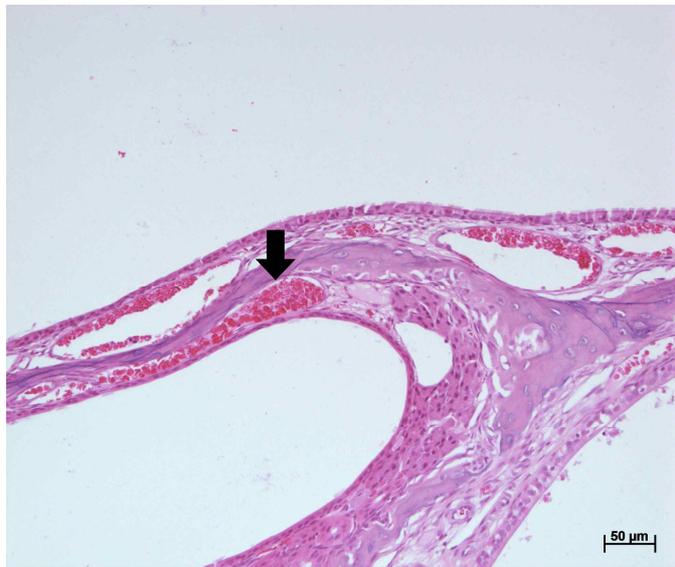
1) 랫드를 이용한 Calcium Sulfate(CAS No. 10034-76-1)의 급성흡입독성시험

(1) 광학현미경 상에서 비강 조직 관찰 결과

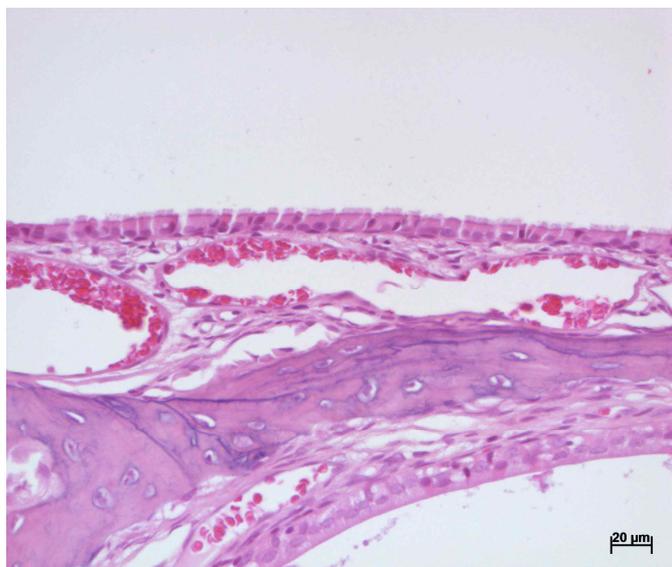
고용량군 랫드의 비강 Level 1, 2, 3에서 각화상피세포, 호흡상피세포, 이행상피세포, 후각상피세포, 후각신경, 골조직, 연골 등을 중심으로 관찰하였으나, 비갑개 점막 하의 혈관의 충혈을 제외하고는 섬모 손상 등 특이적인 소견은 관찰되지 않았다(그림 14 A, B, C).



[그림 14A] 랫드를 이용한 Calcium Sulfate의 급성흡입독성시험의 비강 사진, 비강에서 특이적인 소견은 관찰되지 않았다, HE, ×25.



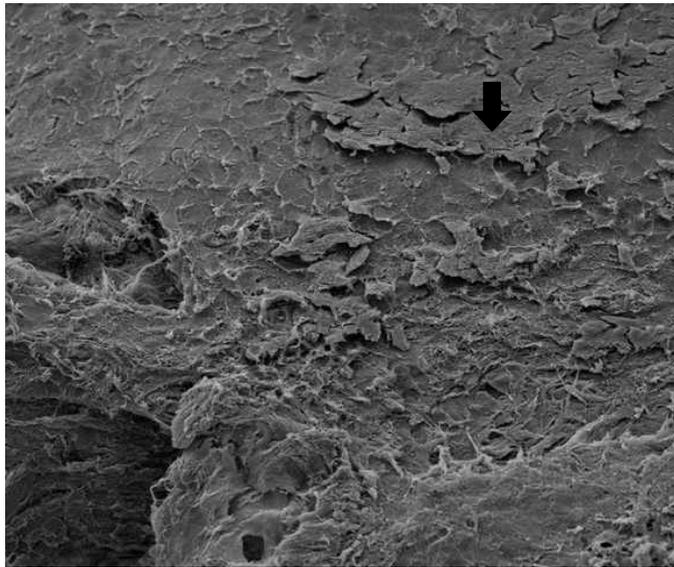
[그림 14B] 랫드를 이용한 Calcium Sulfate의 급성흡입독성시험의 비강 사진, 비갑개의 점막하 혈관에서 충혈(화살표)이 관찰되었다, HE, ×200.



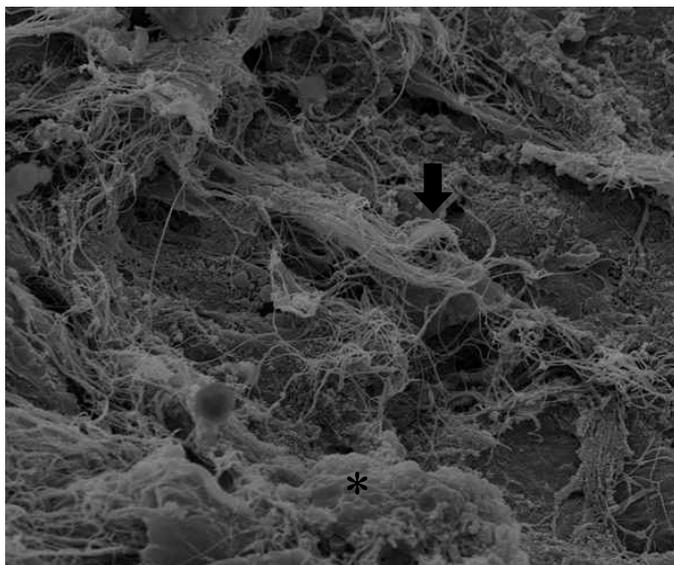
[그림 14C] 랫드를 이용한 Calcium Sulfate의 급성흡입독성시험의 비강 사진, 비갑개의 호흡상피세포에서 섬모 소실 등 손상과 관련 된 소견이 관찰되지 않았다, HE, ×400.

(2) 주사전자현미경 상에서 비강 조직 관찰 결과

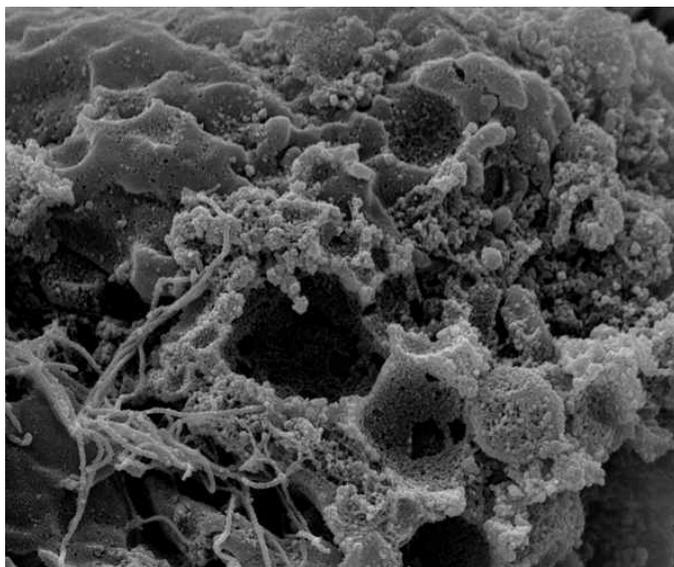
비갑개 점막 부위에서 산발적인 이행상피세포 탈락이 관찰되었다(그림 15A). 실모양의 섬유소와, 적혈구로 추정되는 물질이 혼재되어 있었다(그림 15B). 작은 알갱이 모양의 혈소판이 섬유소와 탈락 상피로 추정되는 구조물과 혼재되어 있는 것이 관찰되었다(그림 15C). 따라서, 본 소견을 종합해 볼 때 비강의 표면에서 국소적으로 미세출혈이 있었던 것으로 판단되었다.



[그림 15A] 랫드를 이용한 Calcium Sulfate의 급성흡입독성시험의 비강 사진, 비갑개 점막 부위에서 이행상피세포의 탈락(화살표)이 일부 관찰되었다, SEM, ×500.



[그림 15B] 랫드를 이용한 Calcium Sulfate의 급성흡입독성시험의 비강 사진, 실모양의 섬유소성 물질(화살표)이 관찰되었다. 탈락 상피와 함께 세포성분(별표)이 있는 것이 확인되었다, SEM, $\times 5,000$.



[그림 15C] 랫드를 이용한 Calcium Sulfate의 급성흡입독성시험의 비강 사진, 알갱이 모양의 혈소판이 섬유소와 탈락 상피로 추정되는 구조물과 혼재되어 있는 것이 관찰되었다,

SEM, $\times 20,000$.

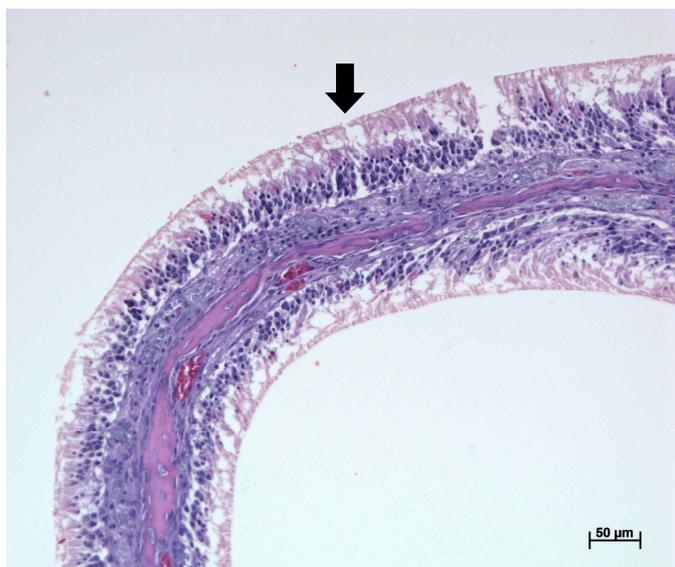
2) 랫드를 이용한 Methyl Formate(CAS No. 107-31-3) 아만성 흡입독성시험

(1) 광학현미경 상에서 비강 조직 관찰 결과

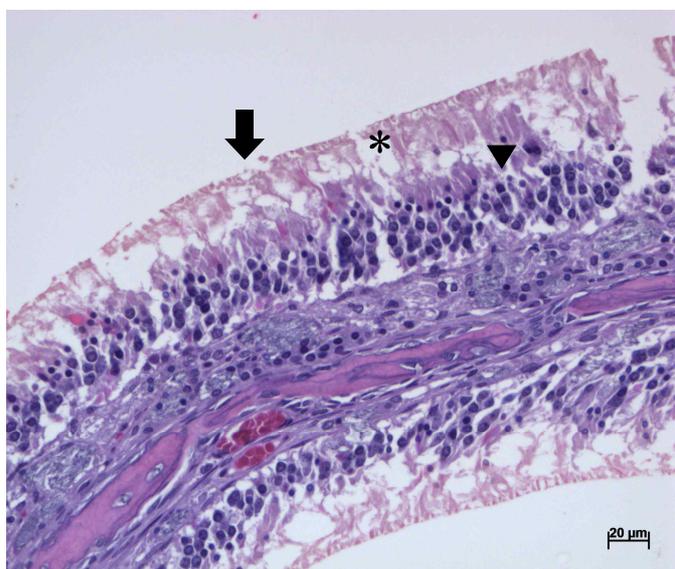
고용량 투여군 랫드의 비강 Level 3의 사골갑개 부위에서 미만성으로 상피 세포질이 염색성이 호산성으로 변화하였고, 세포의 탈락 등이 관찰되었다(그림 16A 및 B). 그리고 후각 상피세포의 섬모가 소실되었으며, 상피 탈락, 세포 층구조 소실 및 핵의 응축이 관찰되었다(그림 16C). 따라서, 본 소견은 후각 상피 세포 변성(Olfactory Epithelium Degeneration)으로 진단하였다



[그림 16A] 랫드를 이용한 Methyl Formate의 아만성 흡입독성시험의 비강 사진, 사골갑개 부위에서 미만성으로 상피 세포질이 염색성이 호산성으로 변화하였고, 세포의 탈락 등이 관찰되었다(화살표), HE, $\times 25$.



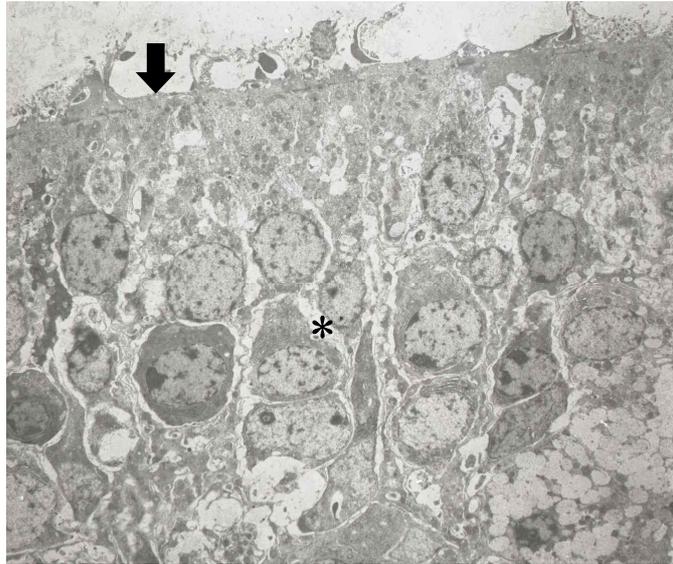
[그림 16B] 랫드를 이용한 Methyl Formate의 아만성 흡입독성시험의 비강 사진, 사골갑개 점막 부위에서 후각상피 세포 탈락(화살표)이 관찰되었다, HE, $\times 200$.



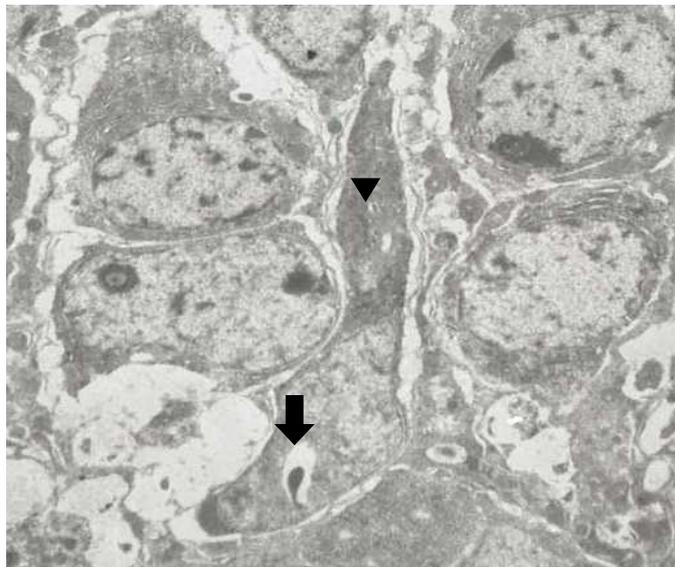
[그림 16C] 랫드를 이용한 Methyl Formate의 아만성 흡입독성시험의 비강 사진, 후각상피세포의 섬모가 소실되었으며(화살표), 상피 탈락(별표), 세포 층구조 소실 및 핵의 응축(화살표 머리)이 관찰되었다, HE, $\times 400$.

(2) 투과전자현미경 상에서 비강 조직 검정 결과

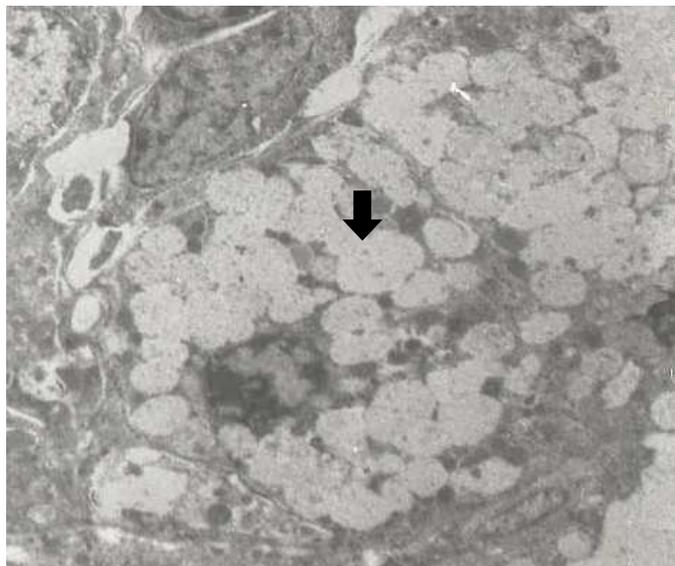
후각상피의 신경지각후각세포, 지지세포 간의 공간의 확장이 관찰되었고, 이들 세포의 섬모소실이 관찰되었다(그림 17A). 상피의 하단 부위에서는 후각신경지각세포의 핵소체의 응축이 관찰이 관찰되었다(그림 17B). 일부세포의 세포질에서는 다수의 공포화(Vacuolation)가 관찰되었다(그림 17C).



[그림 17A] 랫드를 이용한 Methyl Formate의 아만성 흡입독성시험의 비강사진, 후각상피세포의 신경지각후각세포와 지지세포 사이의 공간확장(별표)이 관찰되었고, 이들 세포의 섬모가 소실된 것 관찰되었다(화살표), TEM, $\times 1,500$.



[그림 17B] 랫드를 이용한 Methyl Formate의 아만성 흡입독성시험의 비강사진, 신경지각후각세포의 핵소체 응축(화살표) 및 세포질의 세포소기관(화살표머리)의 소실이 관찰되었다, TEM, $\times 2,750$.



[그림 17C] 랫드를 이용한 Methyl Formate의 아만성 흡입독성시험의 비강사진, 일부세포의 세포질에서 공포화가 다수 관찰되었다(화살표), TEM, $\times 3,500$.

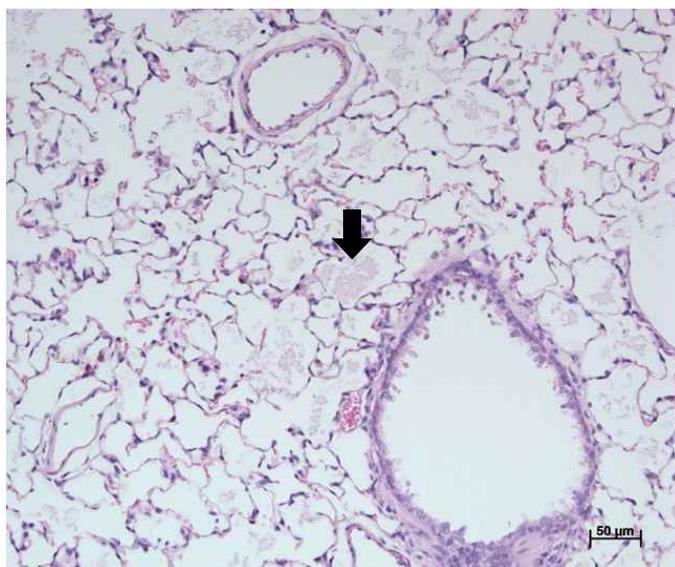
3) 흡입독성자료를 활용한 희토류 물질의 인체 무영향 도출 연구

(1) 광학현미경 상에서 폐 조직 관찰 결과

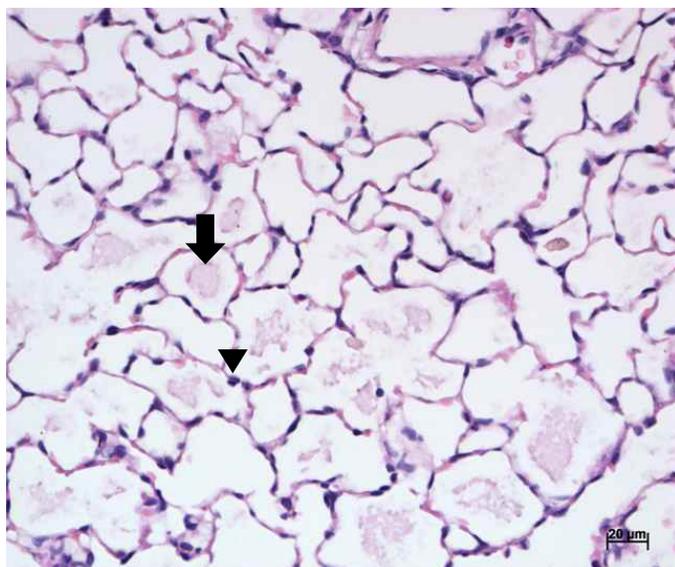
고용량군 랫드에서 미만성으로 폐포의 내강에 창백한 호산성 물질(Eosinophilic Material)이 차 있는 것이 관찰되었다(그림 18A). 고 배율에서 폐포 내강에는 호산성물질이 차 있었고, 일부 폐포 내에서 제2형 폐포 세포들이 미미하게 비대 되어 있는 것이 관찰되었다(그림 18B 및 C). 따라서, 본 소견은 폐포 지질단백증(Alveolar Lipoproteinosis)으로 진단하였다.



[그림 18A] 흡입 독성자료를 활용한 희토류 물질의 인체 무영향 도출연구의 랫드 폐 사진, 폐포에 호산성 물질이 차있는 것이 관찰된다. HE, ×50.



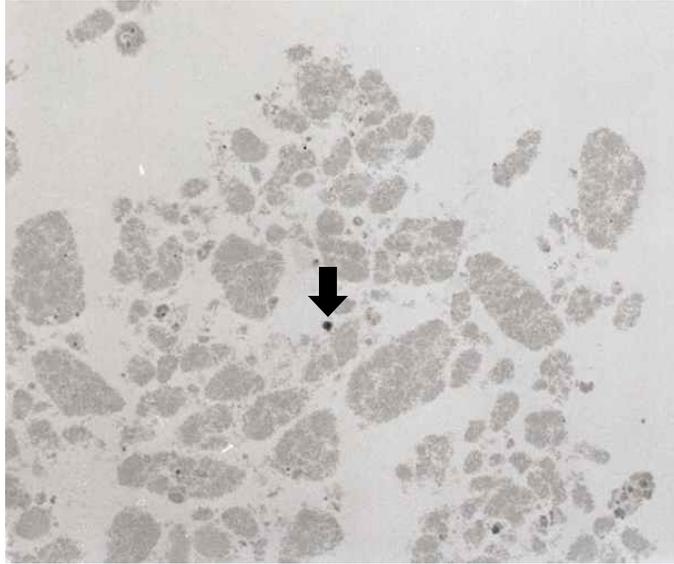
[그림 18B] 흡입 독성자료를 활용한 희토류 물질의 인체 무영향 도출연구의 랫드 폐 사진, 폐포 내에 호산성 물질(화살표)이 차있는 것이 관찰된다, HE, ×200.



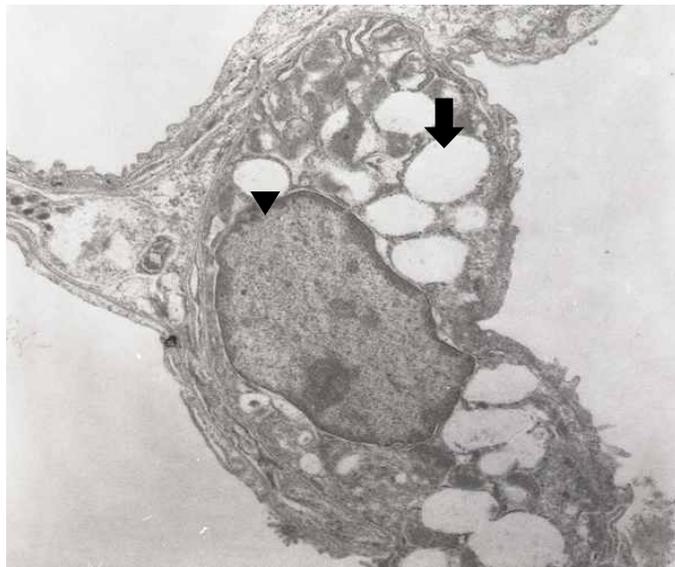
[그림 18C] 흡입 독성자료를 활용한 희토류 물질의 인체 무영향 도출연구의 랫드 폐 사진, 폐포 내강에 호산성물질(화살표)이 차 있었고 일부 폐포 내에서 제2형 폐포세포가 미미하게 비대(화살표 머리)되어 있는 것이 관찰되었다, HE, ×400.

(2) 투과전자현미경 상에서 폐 조직 검경 결과

폐포 내강의 단백질성 물질사이로 전자밀도가 높은 입자가 관찰되었다(그림 19A). 그리고 폐포의 제2형 폐포상피의 세포질에서 층판소체(Lamellar body)의 확장이 공포화로 다수가 관찰되었다. 핵에서는 진정색질(Euchromatin) 부위가 이질염색질(Heterochromatin) 부위보다 커진 것이 관찰되었다(그림 19B).



[그림 19A] 흡입 독성자료를 활용한 희토류 물질의 인체 무영향 도출연구의 랫드 폐 사진, 폐포 내강의 단백질성 물질사이로 전자밀도가 높은 입자(화살표)가 확인되었다, TEM, $\times 1,500$.

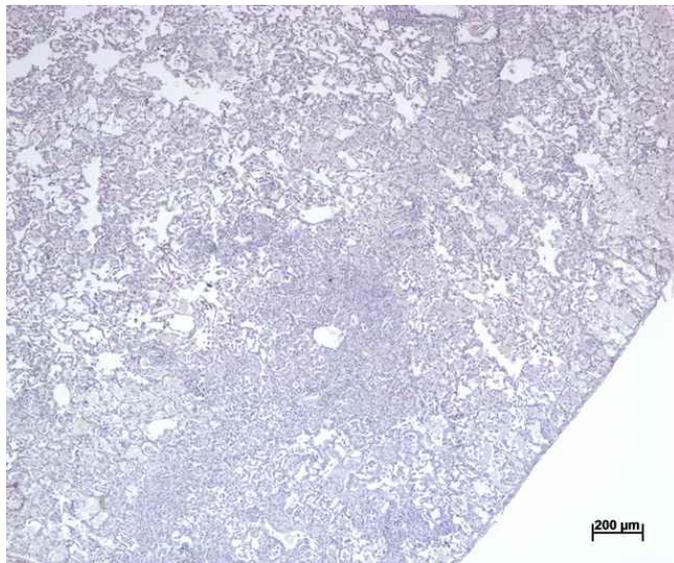


[그림 19B] 흡입 독성자료를 활용한 희토류 물질의 인체 무영향 도출연구의 랫드 폐 사진, 제2형 폐포상피의 세포질에서 증판소체의 확장(화살표)이 관찰되었다. 핵에서 진정염색질 부위가 넓게 확장되었다(화살표 머리), TEM, $\times 5,000$.

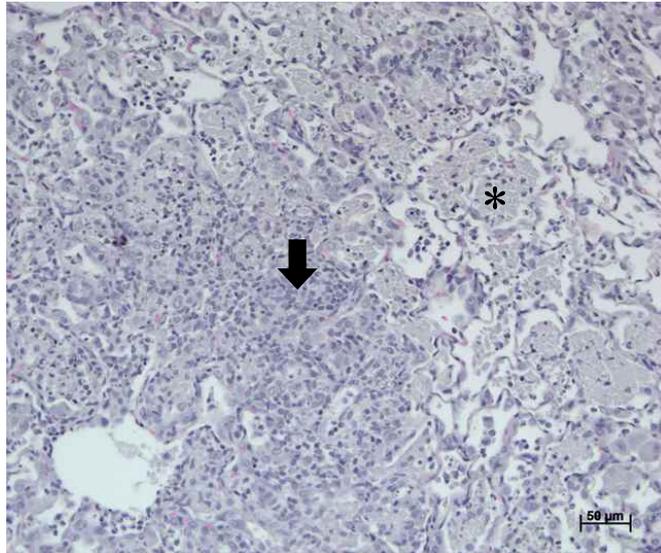
4) 실험동물을 이용한 나노 란탄산화물(La_2O_3)의 흡입독성 연구

(1) 광학현미경 상에서 폐 조직 관찰 결과

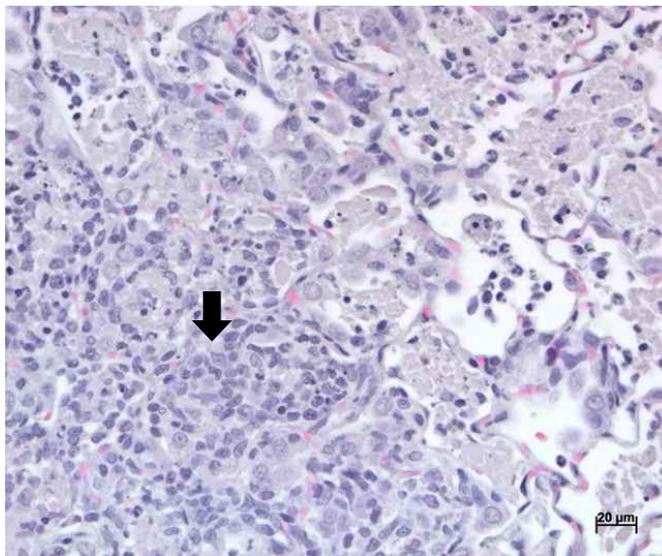
고용량 군 랫드에서 폐포의 내강에 비정상적인 구조물이 미만성으로 차 있는 것이 확인되었다(그림 20A). 일부 폐포에서 조직구로 이루어진 염증세포가 침윤되어 있는 것이 관찰되었으며, 그 주위로 죽은 폐포 대식세포 및 탈락세포가 관찰되었다(그림 20B 및 C). 대부분의 폐포의 내강은 거품성의 대식세포(Foamy Alveolar Macrophage)가 가득차 있었으며, 일부 폐포 상피는 제2형 폐포세포 증식(Type II Alveolar Cells Hyperplasia)가 관찰되었다(그림 20D 및 E). 따라서, 본 소견은 폐포 조직구증(Alveolar Histocytosis)로 진단하였다.



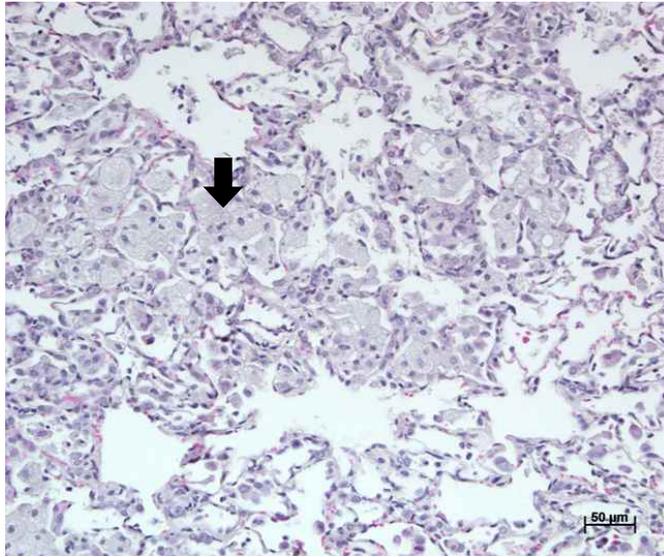
[그림 20A] 실험동물을 이용한 나노 란탄산화물(La_2O_3)의 흡입독성 연구의 랫드 폐 사진, 폐포의 내강이 비정상적인 구조물로 미만성으로 차 있는 것이 확인되었다, HE, $\times 50$.



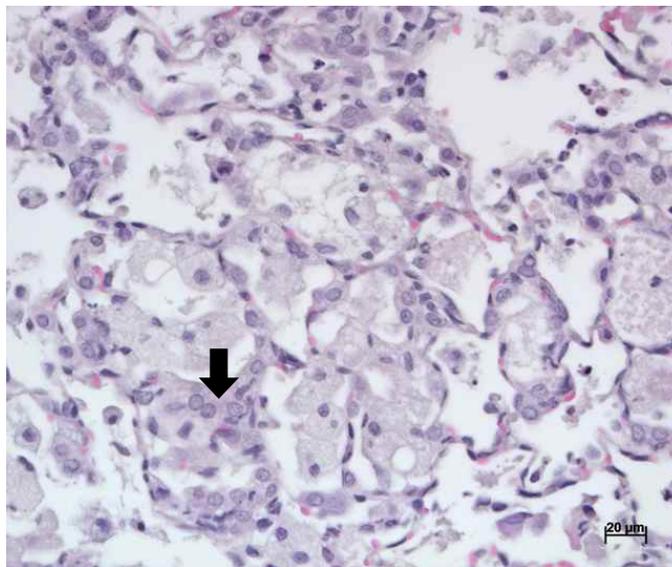
[그림 20B] 실험동물을 이용한 나노 란탄산화물(La_2O_3)의 흡입독성 연구의 랫드 폐 사진, 일부 폐포에서 염증세포가 침윤(화살표)되어 있는 것이 관찰되었으며, 주위로 괴사된 폐포 대식세포가 관찰되었다(별표), HE, $\times 200$.



[그림 20C] 실험동물을 이용한 나노 란탄산화물(La_2O_3)의 흡입독성 연구의 랫드 폐 사진, 염증세포는 주로 대식세포로 이루어져 있었다(화살표), HE, $\times 400$.



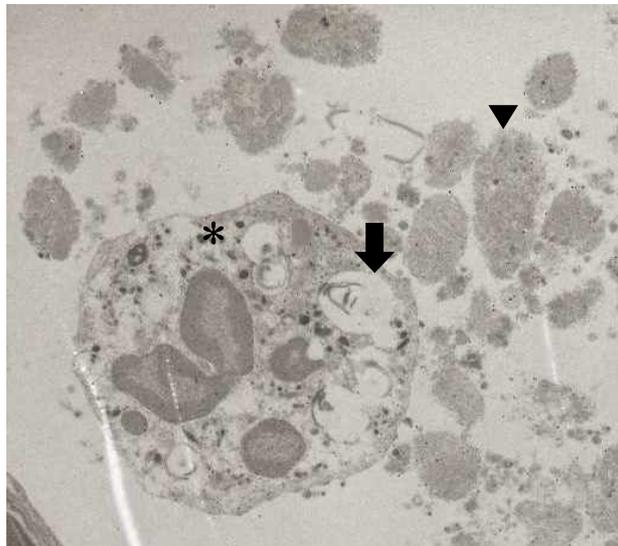
[그림 20D] 실험동물을 이용한 나노 란탄산화물(La_2O_3)의 흡입독성 연구의 랫드 폐 사진, 대부분의 폐포 내강에서 거품성의 대식세포(화살표)가 가득 차 있었다, HE, $\times 200$.



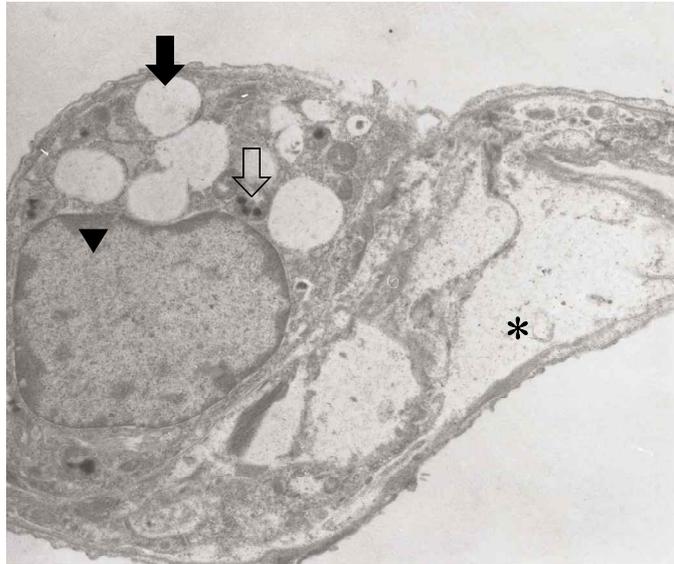
[그림 20E] 실험동물을 이용한 나노 란탄산화물(La_2O_3)의 흡입독성 연구의 랫드 폐 사진, HE, 폐포 내강에서 거품성 대식세포(화살표)가 관찰되고, 폐포상피에서 제2형 폐포세포 증식(별표)이 관찰되었다, HE, $\times 400$.

(2) 투과전자현미경 상에서 폐 조직 검경 결과

폐포 내강의 폐포 대식세포의 세포질에서 다수의 층판소체와 전자밀도 높은 입자가 관찰되고, 세포 주위로 단백질성 물질이 관찰되었다(그림 21A). 그리고 폐포의 제2형 폐포상피세포의 세포질에서는 층판소체의 확장이 공포화로 관찰되고, 기저막과 세포질 사이에 공간이 확장이 되었으며, 미토콘드리아에서 전자밀도가 높은 입자의 축적이 관찰되었다. 또한, 핵에서 진정염색질 부위가 이질염색질부위보다 넓게 관찰되었다(그림 21B).



[그림 21A] 실험동물을 이용한 나노 란탄산화물(La_2O_3)의 흡입독성 연구의 랫드 폐 사진, 폐포 내강의 폐포 대식세포의 세포질에서 층판소체(회살포)가 다수 관찰되었고, 전자밀도가 높은 입자(별표)가 관찰되었으며, 주위로는 단백질성 물질(화살표 머리)이 관찰되었다, TEM, $\times 3,500$.

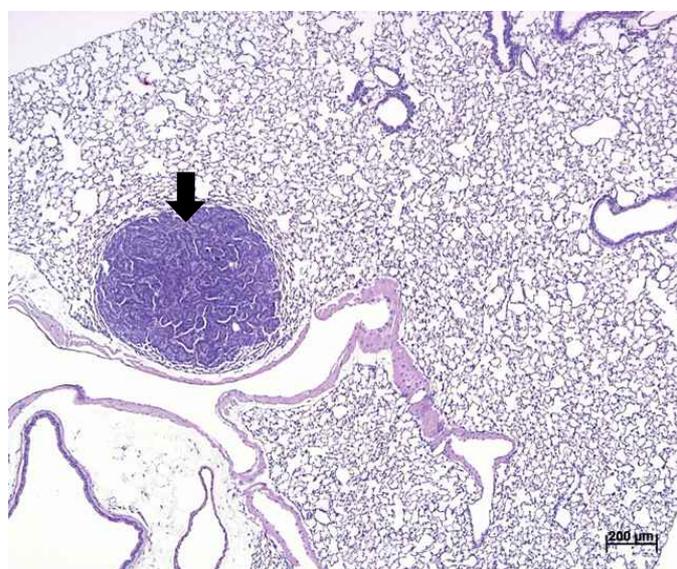


[그림 21B] 실험동물을 이용한 나노 란탄산화물(La_2O_3)의 흡입독성 연구의 랫드 폐 사진. 제2형 폐포상피세포의 세포질에서 증관소체의 확장(검은 화살표) 및 미토콘드리아에서 전자밀도가 높은 입자(흰화살표)가 관찰되었다. 그리고 기저막과 세포질사이 공간이 확장된 것이 관찰되었다(별표). 또한 핵에서 진정염색질 부위가 넓게 확장되었다(검은화살표 머리), TEM, $\times 8,800$.

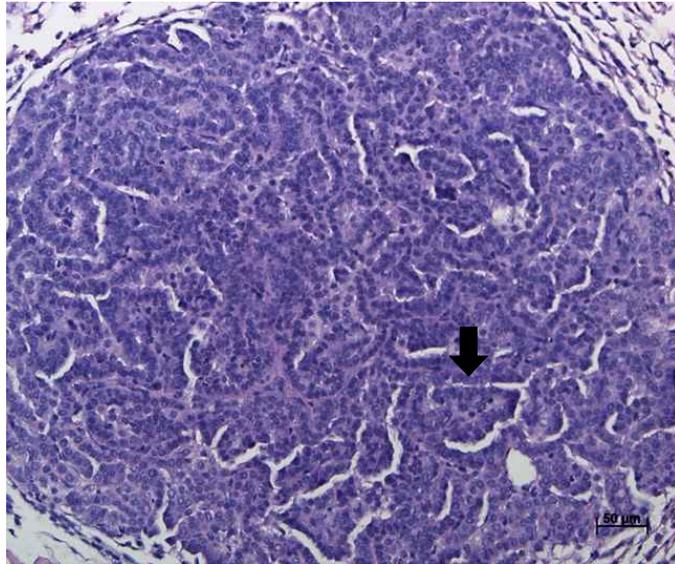
5) 화학물질 노출에 의한 유전자돌연변이(발암)의 조기 확인(II)(실험동물을 이용한 고감도 발암성 확인기법의 검증)

1) 광학현미경 상에서 폐 조직 관찰 결과

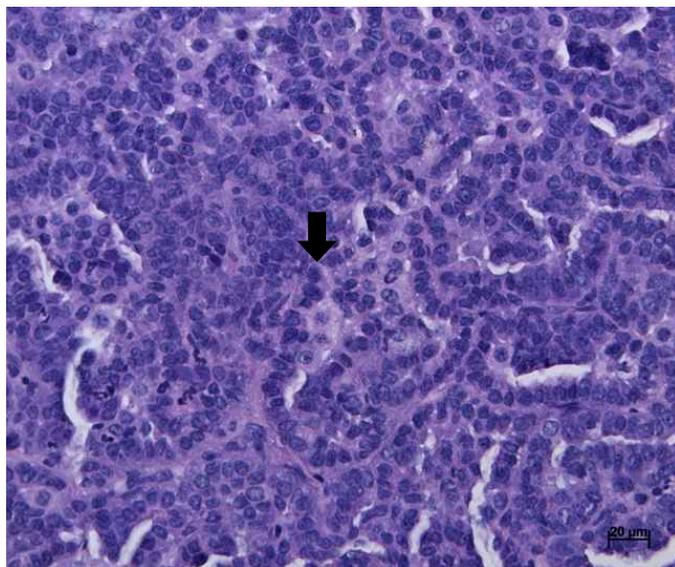
6주 및 11주 투여군에서 정상 폐조직과 경계가 명확한 청자색의 병소가 관찰되었으나 주변조직으로 침습은 관찰되지 않았다(그림 22A). 병소는 원주 또는 입방상피가 유두상 구조를 이루고 있었다. 구성 세포는 세포의 핵과 세포질의 비율은 높았으나 대부분 균일한 형태를 하고 있었으며, 세포 다형성(Cellular Pleomorphism)과 유사분열 (Mitotic Figure)은 관찰되지 않았다. 따라서, 소견은 세기관지-폐포 샘종(Bronchiolo-Alveolar Adenoma)로 진단하였다(그림 22B 및 C).



[그림 22A] 화학물질 노출에 의한 유전돌연변이(발암)의 조기 확인(II)(실험동물을 이용한 고감도 발암성 확인기법의 검증)의 마우스 폐 사진, 정상 주변조직과 구별되는 명확한 경계를 가진 병변이 관찰된다(화살표), HE, X50.



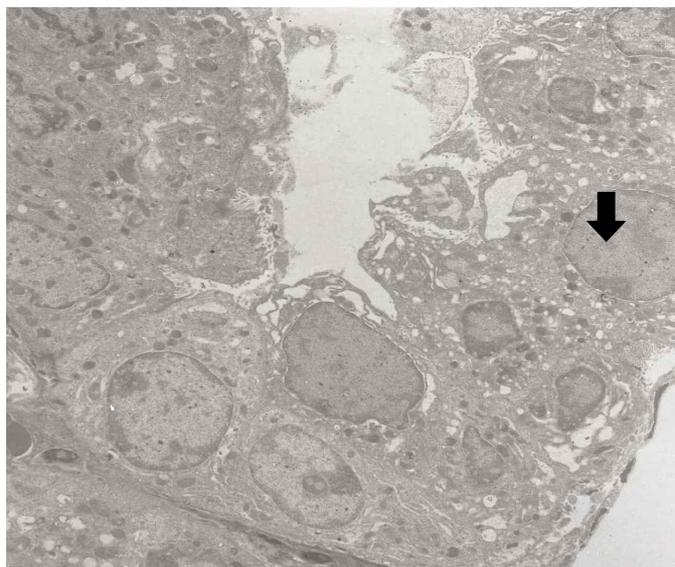
[그림 22B] 화학물질 노출에 의한 유전돌연변이(발암)의 조기 확인(II)(실험동물을 이용한 고감도 발암성 확인기법의 검증)의 마우스 폐 사진, 종양을 구성하는 세포들이 유두상 구조(화살표)를 이루고 있다, HE, ×200.



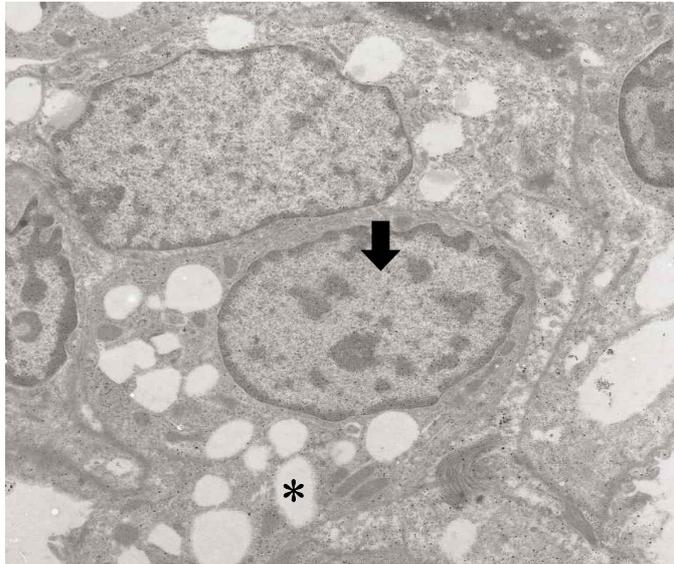
[그림 22C] 화학물질 노출에 의한 유전돌연변이(발암)의 조기 확인(II)(실험동물을 이용한 고감도 발암성 확인기법의 검증)의 마우스 폐 사진, 종양은 핵과 세포질의 비율이 큰 호염성의 원주 또는 입방상피들(화살표)로 균일하게 구성되어 있다, HE, ×400.

(2) 투과전자현미경 상에서 폐 조직 검경 결과

중양세포는 증판 소체가 특징적으로 관찰되는 제2형 폐포상피세포로 이루어 있는 것으로 확인하였다(그림 23A). 중앙의 핵에서 진정염색질 부위가 이질염색질 부위보다 넓게 관찰되었다. 세포질에서는 증판소체가 특징적으로 관찰되었다(그림 23B).



[그림 23A] 화학물질 노출에 의한 유전돌연변이(발암)의 조기 확인(II)(실험동물을 이용한 고감도 발암성 확인기법의 검증)의 마우스 폐 사진, 중앙세포가 제2형 폐포상피세포로 구성된 것이 확인되었다(화살표), TEM, ×2,000.



[그림 23B] 화학물질 노출에 의한 유전돌연변이(발암)의 조기 확인(II)(실험동물을 이용한 고감도 발암성 확인기법의 검증)의 마우스 폐 사진, 중앙의 핵에서 진정염색질(화살표) 부위가 확장되었고, 세포질에서는 확장된 증판소체(별표)가 다수 관찰되었다, TEM, ×5,000.

IV. 고 찰

본 연구에서는 화학물질독성연구실에서 2016년까지 수행한 GLP 시험 및 연구 과제의 고정조직 중에서 비강 또는 폐에서 호흡기계 손상이 있는 시험을 선별하여 광학현미경 검체제작, 주사전자현미경 또는 투과전자현미경 검체제작을 하여 소견을 관찰 비교하였다.

랫드를 이용한 Calcium Sulfate 급성 흡입독성시험에서는 고용량 노출군의 랫드의 비강 조직을 광학 현미경으로 관찰한 결과, 비갑개 점막 하의 충혈 소견이 관찰되었으나, 이는 정상적 범위 안에서 관찰될 수 있는 소견으로 판단되었으며, 그 외 특이적인 소견은 관찰되지 않았다. 하지만 주사전자현미경에서 관찰한 결과, 비강 Level 1의 비갑개 점막 부위에서 산발적인 이행상피세포 탈락이 관찰되었고, 실모양의 섬유소와, 적혈구, 혈소판 및 섬유소가 탈락 상피로 추정되는 구조물과 혼재되어 있는 것이 관찰되었다. 본 소견으로 비강의 표면에서 국소적으로 미세출혈이 있었던 것으로 판단되었다. 하지만 단 1례에서 국소적으로 관찰되어 시험물질에 의한 영향보다는 비부 노출에 의한 흡기 시 물리적 자극 등 우발적 요인으로 인한 발생으로 사료된다.

랫드를 이용한 Methyl Formate 아만성 흡입독성시험에서는 Methyl Formate 고용량군의 랫드에서 비강 Level 3의 사골갑개 부위를 광학현미경에서 관찰한 결과, 후각 상피세포의 섬모가 소실되었으며, 상피 탈락 관찰, 세포 층구조 소실 및 핵의 응축이 관찰되었다. 따라서, 본 소견은 후각상피 세포 변성으로 진단하였다. 투과전자현미경에서 관찰한 결과, 후각상피의 신경지각후각세포, 지지세포, 기저세포 등 이들 세포 사이의 공간의 확장이 관찰되었고, 신경지각후각세포, 지지세포의 섬모소실이 관찰되었으며, 일부 신경지각후각세포의 핵소체의 응축과 세포 소기관 소실이 관찰되었다. 일부 세포의 세포질에서는 다수의 공포화가 관찰되었

다. 후각상피세포와 호흡상피는 화학물질의 자극에 의해 손상을 받기 쉬운 조직이다(이영순 등, 1998). 후각상피세포의 세포 사이 공간 확장은 폐쇄띠, 부착띠, 부착반등 세포 간의 연접 구조물들의 손상에 의해 발생한다(Norman FC, 2009). 공포화가 발생한 세포를 정확히 확인 할 수 없었으나, 후각신경 상피세포는 손상 초기에 세포질의 공포화등이 발생한다(이영순 및 장자준 등, 1998). 신경지각후각 세포는 주위 지지세포보다 세포 변성이 심한데, 신경세포는 산화적 손상, 혈류 통한 당공급 장애에 취약해 다른 조직보다 손상이 입기 쉽다(McGavin MD and Zachary JF, 2007).

흡입독성자료를 활용한 희토류 물질의 인체 무영향 도출 연구에서는 고용량 나노 네오디움 산화물 고용량군 랫드의 폐를 광학현미경에서 관찰한 결과, 폐포의 내강 안에 창백한 호산성 물질이 차 있는 것이 관찰되었다. 그리고 폐포 내에서 제2형 폐포 상피세포들이 미미하게 비대 되어 있는 것이 관찰되었다. 따라서, 본 소견은 폐포 지질단백증으로 진단하였다. 폐포 지질단백증은 실리카(Silica), 석면(Abestos) 등 분진, Nitrogen oxide 등 Gas, Ambroxol 등 수용성 용제 뿐만 아니라 Amiodrone, Chlorimipramine, Clofibrate 등 약물의 독성시험에서도 확인된 바 있다(Hook GE, 1991). 투과전자현미경에서 관찰한 결과, 폐포 내강의 단백질성 물질과 함께 단백질성의 시험물질이 관찰되었다. 그리고 폐포의 제2형 폐포 상피의 세포질에서 층판소체의 확장이 관찰되었다. 또한, 핵의 진정염색질 부위가 이질염색질 부위보다 커진 것이 관찰되었다. 폐포 내강 내에서 관찰되는 단백질성 물질은 계면활성제로 제2형 폐포세포의 층판소체에서 유래되는 것으로 알려져 있으며(Hook GE, 1991), 인지질 및 단백질 성분으로 폐포로 분비되어 폐포의 허탈을 막는 역할을 하는 것으로 알려져 있다(이준섭 등, 2001). 이런 인지질 성분의 폐포 내 축적은 호흡기능부전 또는 호흡곤란을 유발할 수 있다(Hook GE, 1991). 폐포내강 내 전자밀도가 높은 입자는 시험물질인 나노입자로 사료되며, 단백질성 물질인 계면활성제와 같이 내강 내에서 관찰되었다. 따라서, 시험물질이 제2형 폐포 상피로 흡수 되었다가 계면활성제를 통해서 내강 분비되었을 가능성

이 있다. 제2형 폐포세포에서 층판소체는 주로 공포화로 관찰되거나, 전형적인 형태와 다르게 관찰되었다. 이것은 조직전처리 과정에서 막변성에 의해 유발 될수 있는 것으로 보고되고 있다(Takayama et al. 1994, 1995). 또한, 핵에서 진정염색질 부위보다 이질염색질 부위가 많이 관찰되는 것은 세포가 활동인 상태로 판단할 수 있다(이준섭 등, 2001). 따라서, 광학현미경에서 제 2형 세포 비대 소견과 일치한다.

실험동물을 이용한 나노 란탄산화물(La_2O_3)의 흡입독성 연구에서는 나노란탄산화물 고용량군 랫드의 폐를 광학현미경에서 관찰한 결과, 폐포의 내강이 대부분 거품성의 대식세포가 가득 차 있는 것이 확인되었으며, 일부 폐포에서 조직구로 이루어진 염증세포가 침윤되어 있는 것이 관찰되었으며, 그 주위로 죽은 폐포 대식세포 및 탈락세포가 관찰되었다. 그리고 일부 폐포 상피에서는 제2형 폐포세포 증식이 관찰되었다. 따라서, 본 소견은 폐포 조직구증으로 진단하였다. 투과전자현미경에서 관찰한 결과, 폐포 내강의 폐포 대식세포의 세포질에서 다수의 층판소체와 전자밀도 높은 입자와 세포 주위로 단백질성 물질이 관찰되었다. 그리고 폐포의 제2형 폐포상피세포의 세포질에서는 층판소체의 확장 및 기저막과 세포질 사이에 공간이 확장되고, 미토콘드리아에서 시험물질의 축적이 관찰되었다. 핵에서 진정염색질 부위가 이질염색질부위보다 넓게 관찰되었다. 폐포 대식세포 내 층판소체는 제2형 폐포상피의 층판소체와 동일한 유래로 판단되며, 폐포세포 내 층판 소체는 선행된 폐포 지질단백증에서 폐포 대식세포가 폐포 계면활성제를 과도하게 탐식하여 발생한 것으로, 이는 광학현미경 상에서 관찰되는 거품성 대식세포 형태의 원인으로 판단된다. 보통, 폐포 계면 활성제는 폐포 대식세포에 의해 분해되는데 이런 폐포 조직구증은 인지질 성분을 분해하지 못하고 축적되었을 때 발생한다(Boorman GA, 1990). 그리고 전자밀도가 높은 입자가 폐포 대식세포 내에서 관찰되었는데, 이는 시험물질 나노입자로 사료된다. 제2형 폐포 세포의 미토콘드리아에서 시험물질인 나노입자의 축적이 관찰되었는데, 나노 카디

움 산화물을 ICR 마우스에 노출한 시험에서도 이와 유사하게 시험물질인 나노입자가 미토콘드리아에서 관찰되었다(Dumkova J et al, 2016). 또한, 기저막과 세포질 사이의 확장은 기저막 손상에 의해서 발생된 것으로 사료되며, 이는 기존 문헌에서도 보고되고 있다(Norman FC, 2009). 그리고, 핵에서 진정염색질 부위 증가는 세포 활동성 증가 지표로 알려져 있다(Norman FC, 2009). 따라서, 광학현미경 상에서 제2형 폐포세포 증식과 일치한다.

화학물질 노출에 의한 유전자돌연변이(발암)의 조기 확인(II)(실험동물을 이용한 고감도 발암성 확인기법의 검증) 연구에서는 우레탄 투여군 마우스의 폐를 광학현미경서 관찰한 결과, 정상 폐조직과 경계가 명확한 청자색의 병소가 관찰되었으나, 주변조직으로 침습은 관찰되지 않았다. 세포의 세포질은 호염성인 원주상피로 유두상 구조를 이루고 있었다. 세포의 형태는 대부분 일정하였으며, 세포 다형성과 유사분열은 관찰되지 않았다. 따라서, 본 소견은 세기관지-폐포 샘종로 진단하였다. 투과전자현미경에서 관찰한 결과, 핵에서 진정염색질 부위가 이질염색질 부위보다 넓게 관찰되었고, 종양의 세포질에서는 층판 소체가 다수 관찰되었으므로, 종양이 제2형 폐포상피 세포로부터 유래된 것을 확인할 수 있었다. 기존 문헌에서도 폐포-기관지 샘종이 폐포의 제2형 폐포상피세포 또는 기관지의 클라라 세포에서 유래되는 것으로 알려져 있다(Boorman GA, 2009). 그리고 핵에서 진정염색질 부위 보다 이질염색질 부위가 많이 관찰되는 것은 종양이 활동성으로 증식하고 있는 것으로 판단할 수 있다(이준섭 등 2001).

V. 결 론

본 연구는 생물시료의 전자현미경 검체 제작 및 관독 기법 확립을 하고 화학물 질독성연구실에서 그동안 수행한 흡입독성시험에서 대표적인 호흡기계 손상 소견을 광학 현미경과 전자현미경을 이용하여 비교 확인하였다.

1. 랫드를 이용한 Calcium Sulfate 급성 흡입독성시험에서는 고용량 노출군의 랫드의 비강을 광학현미경에서 관찰한 결과, 비갑개 점막 하 충혈 소견이 관찰되었으나, 이는 부검 시 정상적인 범위 안에 관찰될 수 있는 정도로 판단되었으며, 그 외 특이적인 소견은 관찰되지 않았다. 하지만 주사전자현미경에서 관찰한 결과, 비강 Level I의 비갑개 점막 부위에서 산발적인 이행상피세포 탈락이 관찰되었고, 실모양의 섬유소와, 적혈구, 혈소판 및 섬유소가 탈락 상피로 추정되는 구조물과 혼재되어 있는 것이 관찰되었다. 따라서 본 소견은 미세출혈로 판단되었다.

2. 랫드를 이용한 Methyl Formate 아만성 흡입독성시험에서는 Methyl Formate 고용량군 랫드의 비강의 Level 3의 사골갑개 부위를 광학현미경에서 관찰한 결과, 후각 상피세포의 섬모가 소실되었으며, 상피의 공포화 관찰, 세포 층 구조 소실 및 핵의 응축이 관찰되었다. 따라서, 이는 후각상피 세포 변성으로 판단되었다. 투과전자현미경에서 관찰한 결과, 후각상피의 신경지각후각세포, 지지세포 간의 공간의 확장이 관찰되었고, 이들 세포의 섬모소실이 관찰되었다, 신경지각후각세포의 핵소체의 응축과 세포질에서 세포소기관 소실이 관찰되었다. 일부 세포의 세포질에서는 다수의 공포화가 관찰되었다.

3. 흡입독성자료를 활용한 희토류 물질의 인체 무영향 도출 연구에서는 나노 네오디움 산화물 고용량군 랫드의 폐를 광학현미경에서 관찰한 결과, 폐포의 내강 안에 창백한 호산성 물질이 차 있는 것이 관찰되었다. 그리고 폐포 내에서 제2형 폐포 상피세포들이 미미하게 비대 되어 있는 것이 관찰되었다. 따라서 이는 폐포 지질단백증으로 판단된다. 투과전자현미경 관찰 시, 폐포 내강의 단백질성 물질과 전자밀도가 높은 시험물질인 나노입자가 관찰되었다. 그리고 폐포의 제2형 폐포상피세포의 세포질에서 확장된 층판소체가 다수 관찰되었다. 또한, 핵의 진정염색질 부위가 이질염색질 부위보다 커진 것이 관찰되었다.

4. 실험동물을 이용한 나노 란탄산화물(La_2O_3)의 흡입독성 연구에서는 나노 란탄 산화물 고용량 노출군의 랫드의 폐를 광학현미경에서 관찰 한 결과, 폐포의 내강이 대부분 거품성의 대식세포가 가득 차 있었으며, 일부 폐포에서 조직구로 이루어진 염증세포가 침윤되어 있는 것이 관찰되었으며, 그 주위로 죽은 폐포 대식세포 및 탈락세포가 관찰되었다. 그리고 일부 폐포 상피에서는 제2형 폐포세포 증식이 관찰되었다. 따라서, 본 소견은 폐포 조직구증으로 판단하였다. 투과전자현미경에서 관찰 결과, 폐포 내강의 폐포 대식세포의 세포질에서 다수의 층판소체와 전자밀도 높은 시험물질인 나노 입자가 관찰되었으며, 세포 주위로 단백질성 물질이 관찰되었다. 그리고 폐포의 제2형 폐포상피세포의 세포질에서는 층판소체의 확장 및 기저막과 세포질 사이에 공간이 확장되고, 미토콘드리아에서 시험물질의 축적이 관찰되었다. 핵에서 진정염색질 부위가 이질염색질부위보다 넓게 관찰되었다.

5. 화학물질 노출에 의한 유전자돌연변이(발암)의 조기 확인(II)(실험동물을 이용한 고감도 발암성 확인기법의 검증)에서 우레탄 투여군 마우스의 폐를 광학현미경에서 관찰한 결과, 정상 폐조직과 경계가 명확한 청자색의 병소가 관찰되

었으나 주변조직으로 침습은 관찰되지 않았다. 세포의 세포질은 호염성인 원주상 피로 유두상 구조를 이루고 있었다. 세포의 형태는 대부분 일정하였으며, 세포 다형성과 유사분열은 관찰되지 않았다. 따라서, 소견의 진단명은 세기관지-폐포 샘종로 진단하였다. 투과전자현미경에서 관찰한 결과, 종양은 제2형 폐포상피세포 유래인 것을 확인하였으며, 핵에서 진정염색질 부위가 이질염색질 부위보다 넓게 관찰되었고, 종양의 세포질에서는 층판소체가 관찰되었다.

VI. 참고문헌

- 김현영, 랫드를 이용한 Methyl Formate 아만성 흡입독성시험, 산업안전보건연구원 2009년 GLP 시험보고서, 2009년.
- 김용순, 이용훈, 신서호, 흡입독성자료를 활용한 희토류 물질의 인체 무영향 도출 연구의 군구성, 산업안전보건연구원 2016년 연구보고서, 2016년.
- 김종규, 랫드를 이용한 Calcium Sulfate 급성 흡입독성시험, 산업안전보건연구원 2016년 GLP 시험보고서, 2016년.
- 김대중. 전자현미경 매뉴얼, 고려의학;1995;1-137쪽.
- 김동섭, 김신희, 김형욱 등. 독성병리진단기준해설: 호흡기계. 국립독성과학원, 2008년, 1-101쪽.
- 박창현, 조강용, 엄창섭. 생물시료의 전자현미경 시료제작 및 제작과정에서 발생 되는 인공물, 한국전자현미경학회지, 제35권;제1호;2005;1-13쪽.
- 양기화, 강부현, 김용범 등. 독성병리용어집. 국립독성연구원, 2003, 1-285쪽.
- 이영순, 장자준. 독성병리학, 도서출판 샤론, 1998, 85-94쪽.
- 이준섭, 강종구, 박수동 등. 최신 수의조직학, 이공월드, 2001, 148-163쪽.
- 임경택, 김수진, 화학물질 노출에 의한 유전자돌연변이(발암)의 조기 확인(II)의 군구성, 임경택, 산업안전보건연구원, 2016년 연구보고서, 2016년.
- 임철홍, 김용순, 신서호, 실험동물을 이용한 나노 란탄산화물(La₂O₃)의 흡입독성 연구, 산업안전보건연구원 2015년 연구보고서, 2015년.

- 윤철중. 전자현미경의 원리와 응용, 2011년 전자현미경 직무연수 교재, 서울시과학전시관, 2001년, 1-12쪽.
- 정석균, 전정범. 주사전자현미경의 기본원리와 응용(Part I)공업화학 전망, 제12권; 제6호;2009;39-46쪽.
- Barbara Y, James SL, Alan S et al. Wheater's Functional Histology: A Text and Colour Atlas, sixth edition, Elsevier, USA, 2006, pp1-33.
- Boorman GA. Pathology of the Fischer Rat : Rreference and Atlas, Academic Press, San Diego, USA, 1990, pp339-367.
- Cheville NF, Stasko J. Techniques in Electron Microscopy of Animal Tissue Vet Pathol 2013;00(0)1-14.
- Dumkova J, Vrlikova L, Vecera Z et al. Inhaled Cadmium Oxide Nanoparticles: Their in Vivo Fate and Effect on Target Organs. Int J Mol Sci. 2016; 3;17(6). pii: E874. doi: 10.3390/ijms17060874.
- Gamer AO, Leibold E, Deckardt K, et al. The Effects of Styrene on Lung cells in Female Mice and Rats. Food Chem Toxicol. 2004;42(10);1655-67.
- Hook GE. Alveolar Proteinosis and Phospholipidoses of the Lungs. Toxicol Pathol. 1991;19:482-513.
- Hubbs AF, Goldsmith WT, Kashon ML et al. Respiratory Toxicologic Pathology of Inhaled Diacetyl in Sprague-Dawley rats. Toxicol Pathol. 2008;36(2):330-44.
- Li B, Ze Y, Sun Q et al. Molecular Mechanisms of Nanosized Titanium Dioxide-Induced Pulmonary Injury in Mice. PLoS One. 2013;8(2):e55563. doi: 10.1371/journal.pone.0055563. Epub 2013 Feb 7.

- McGavin MD, Zachar JF. Pathologic Basis of Veterinary Disease, fourth edition, Mosby, MO, USA, 2007, pp833-971.
- Norman FC. Ultrastructural Pathology the Comparative Cellular Basis of Disease, Second Edition. Wiley-Blackwell, Iowa, USA, 2009, pp2-22, 717-740.
- Renne R1, Brix A, Harkema J et al. Proliferative and Nonproliferative Lesions of the Respiratory Tract of the Rat and Mouse. Toxicol Pathol 2009;37(7 Suppl):5S-73S.
- Takayama I, Fuji Y, Ohno S et al. Ultrastructural study of mast cells stimulated with compound as revealed by quick-freezing method,. Virchows Archiv, 1994;424;287-294.
- Takayama I, Fuji Y, Ohno S et al. Freeze fracture immunocytochemistry for intracellular localization of serotonin in rat mast cells stimulated with compound 48/80. Virchows Archiv 1995;426;267-270.

참고 사이트

- 조직의 채취 및 고정, 서울대학교 치학연구소 전자현미경 연구소 자료실
<http://dri.snu.ac.kr/microscope/downloads?bm=a&act=DOWN&bbsidx=111&fileidx=82>
- <http://www.woomyoung.co.kr/down.php?name=1142489808TEM-Biological%20Sample%20Preparation%20for%20TEM.doc>
- http://www.ecolabs.co.kr/boarddata/bbs_2/1268191516_%EC%A1%B0%EC%A7%81%EA%B4%80%EC%B0%B0.pdf
- <http://ienet.re.kr/download/download.jsp%3Ffilename%3D%25C0%25CC%25B1>

%25D8%25C8%25F1.hwp&rct=j&frm=1&q=&esrc=s&sa=U&ved=0ahUKEwi
_z4GJx67QAUGw7wKHYN0DacQFggaMAA&usg=AFQjCNFwSvvgQkaj
NnvEJBEUXhagQVLEMw

Abstract

A Study on the Injury of Respiratory System Using Electron Microscopy in Toxicity Study

Yong-Hoon Lee, Yong Hyun Chung, Jeong-Hee Han

*Chronic Inhalation Toxicity Research Center,
Occupational Safety and Health Research Institute, KOSHA
#339-30, Expo-ro Yuseong-Gu, Daejeon 305-380, Korea*

Objectives

Respiratory system of workers is mainly affected by chemicals exposed in factory. High sensitive diagnostic technique is demanded to identify chemical damaging the respiratory system in toxicity studies. Electron microscopy can provide the information for the ultrastructural changes of organelle, distribution of test substance, and the ultrastructural changes of cell surface because the specimen can be observed using it at one million of magnifications to the maximum. Therefore, the objective of this study is to establish the method of electron microscopy sample processing for biological specimen and characterize the lesions of respiratory system using electron microscopy.

Methods

In this study, we collected organs of respiratory system from toxicity studies conducted in Occupational Safety and Health Research Institute and processed them for light and electron microscopic examination. And then, we compared them and characterize the ultrastructural lesions of respiratory system in toxicity studies.

Results

In acute toxicity study of calcium sulfate in rats, congestion of vessel in level 1 of nasal cavity was observed in rat exposed to high dose in light microscopic examination. But, this is not considered as test substance-related change because it could be caused accidentally during necropsy. However, transitional cells were detached and fibrins, erythrocytes, and platelets was mixed in nasoturbinates of level 1 in nasal cavity in SEM examination.

In subchronic toxicity study of methyl formate in rats, loss of cilia, sloughing of epithelial cells, loss of cell layer and pyknosis in olfactory epithelium of level 3 of nasal cavity was observed in rat exposed to high dose in light microscopic examination. This result indicated this lesion is degeneration of olfactory epithelium. Loss of cilia of olfactory neurosensory cell, sustentacular cells, enlarged intercellular space, condensation of nucleolus and loss of cell organelles of olfactory neurosensory cell in olfactory epithelium were observed in ethmoturbinates of level 3 of nasal cavity in TEM examination. Also, vacuolation of cytoplasm in some cells was observed.

In study on a 4-week inhalation toxicity study of nano-sized neodium oxide aerosols followed by a 4-week recovery in Sprague-Dawley rats. Pale eosinophilic materials in alveolar lumens of lung and minimal hypertrophy of

type II alveolar cells were observed in rat exposed to high dose in main phase in light microscopic examination. This result indicated this lesion is alveolar lipoproteinosis. Proteinous materials with nano-sized particles, test substances was observed in alveolar lumen. Also, enlargement of lamellar bodies in cytoplasm and of euchromatin in nuclei were observed in Type II alveolar epithelium in TEM examination.

In study on a 4-week inhalation toxicity study of nano-sized lanthanum oxide aerosols followed by a 4-week recovery in Sprague-Dawley rats, foamy alveolar macrophages was filled in alveolar lumens of lung and histocytic inflammatory cells surrounded by necrotic alveolar macrophage and detached cells and type 2 alveolar cell hyperplasia were partially observed in rat exposed to high dose in recovery phase in light microscopic observation. Therefore, this result indicated this lesion is alveolar histocytosis. Lamellar bodies and nano-sized particles, test substances was observed in cytoplasm of alveolar macrophage. Also, enlargement of lamellar bodies in cytoplasm and of euchromatin in nuclei and enlarged space between cytoplasm and basement membrane were observed in Type II alveolar epithelium in TEM observation. In addition, accumulation of nano-sized particles, test substances was observed in mitochondria.

In study on early detection of gene mutation(carcinogenesis) in mouse exposed to urethane, Round basophilic focus sharply demarcated from the surrounding tissue was observed in mouse exposed to high dose in light microscopic observation. it was composed predominantly of delicate papillary structures lined by deeply basophilic columnar cells. Cell pleomorphism and mitotic figure was not observed. Therefore, this result indicated this lesion is bronchiolo-alveolar adenoma. Also, increase of enlarged lamellar body in

cytoplasm and enlargement of euchromatin in nuclei were observed in Type II alveolar epithelium in TEM examination.

Conclusion

In this study, the method of electron microscopy sample processing for biological specimen was established. And the ultrastructural lesions of respiratory system can be characterized. It is expected to understand the mechanism of damage of respiratory system in toxicity studies using electron microscopy.

Key words : Electron Microscopy, Toxicological Pathology, Respiratory System, Toxicity study

<<연 구 진>>

연 구 기 관 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원

연구책임자 : 이 용 훈 (연구위원, 화학물질독성연구실)

연 구 원 : 정 용 현 (부 장, 화학물질독성연구실)

한 정 희 (연 구 원, 화학물질독성연구실)

<<연 구 기 간>>

2016. 2. 1 ~ 2016. 11. 30

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

산업안전보건연구원장

전자현미경을 이용한 호흡기계 조직 손상 연구

(2016-연구원-1249)

발 행 일 : 2016년 11월
발 행 인 : 산업안전보건연구원 원 장 김장호
연구책임자 : 화학물질독성연구실 연구위원 이용훈
발 행 처 : 안전보건공단 산업안전보건연구원
주 소 : (44429) 울산광역시 중구 종가로 400
전 화 : (042) 869-8532
F A X : (042) 863-8694
Homepage : <http://oshri.kosha.or.kr>
