

연구보고서

살생제 (Benzalkonium chloride)의 호흡기계 독성연구

이용훈 · 서동석 · 김민하

요 약 문

연구기간

2019년 1월 1일 ~ 2019년 11월 30일

핵심 단어

Benzalkonium chloride, 알레르기, 산화스트레스

연구과제명

살생제(Benzalkonium chloride)의 호흡기계 독성연구

1. 연구 배경

살생제란 유해한 생물체를 제거 및 제어하기 위한 화학물질로, 2011년에는 가슴기 살균제가 임산부 또는 영유아의 원인불명의 폐질환을 유발하여 사망하는 사건이 발생하여, 살생제가 사회적으로 큰 문제가 되었으나, 아직까지 독성이 밝혀지지 않은 살생제가 많이 있다. BKC는 4 급 암모늄 구조를 가진 양이온성 계면활성제로서 산업, 생활, 의료환경에서 살균제 또는 보존제로 사용되어 왔으나, 그동안 흡입독성에 대한 연구는 많이 이루어지지 않았다. 가슴기 살균제 성분으로 사용되었던 Benzalkonium chloride(BKC)는 2018년 산업안전보건연구원에서는 13주 흡입 독성시험을 수행하여 비강 등 호흡기계 장기가 표적장기로 관찰되어 NOAEL(No-observed-adverse-effect level, 무영향관찰용량)을 확인하였으나 독성원인을 분석하기 위해서는 호흡기계 독성기전 연구가 필요하다. 따라서, 본 연구에서는 BKC 90일 아만성 시험의 시료에서 병리진단기법을 이용하여 알레르기 비염, 산화스트레스, 세기관지 폐포 연접부 평활근 비대가 유발되는 호흡기계 독성기전을 확인하고, 이를 이용하여 BKC 취급 근로자 및 소비자에게 유용한 정보를 제공하고자 한다.

2. 주요 연구내용

- 연구결과

F344 랫드에 각각 대조군($0\text{mg}/\text{m}^3$) 및 BKC군($1.8\text{mg}/\text{m}^3$)으로 나누어 전신노출하고, 호흡기계 조직에서 조직병리학적 검사, 혈액학적 검사, Astra Blue-Vital New Red, Alcian blue-PAS 및 MT 특수염색, 면역조직화학, BALF ELISA 검사를 실시하였다. 알레르기 반응과 관련하여 면역조직화학과 BALF ELISA 결과, 비강에서 MUC5AC, $\text{TNF-}\alpha$, IL-4, IL-5, IgE은 대조군과 비교하여 BKC군의 유의한 증가가 확인되었으며, 산화스트레스 표지자인 8-OHdG 면역조직화학 결과, BKC군에서는 비강, 후두, 기관, 폐에서 모두 대조군과 비교하여 BKC군에서 면역조직화학 점수가 유의하게 증가하였다. 세기관지 폐포 연접부 평활근 비대 기전을 확인하기 위하여 α -SMA와 $\text{TGF-}\beta$ 의 면역조직화학을 실시한 결과, 모두 대조군과 비교 시 면역조직화학 점수가 증가하였다.

- 시사점

이상의 결과로 BKC는 호흡기계에게 산화스트레스를 유발하며, 특히 비강에서 산화 스트레스를 유발하여 조직을 손상시키고, IL-4, IL-5, $\text{TNF-}\alpha$ 사이토카인에 의해 호산구 침윤 및 점액이 과다 분비되는 알레르기 반응을 유발하며, 폐에서도 산화스트레스가 $\text{TGF-}\beta$ 사이토카인을 유도하여 세기관지 폐포 연접부의 평활근 비대를 유도한다.

3. 연구 활용방안

- 제언

본시험은 실험동물 흡입시험에서 살생제인 BKC가 알레르기 비염을 유발하

는 것이 증명이 되었다. 따라서, 근로자 및 소비자들은 BKC를 사용 할 때, 이런 알레르기 비염 질환 예방을 위해서는 마스크 등 보호구를 착용하거나 환기 시설 운영을 점검하여 BKC 사용에 주의를 기울이는 것이 필요하다.

- 활 용

○ 알레르기 질환의 병리진단기법 확립

○ 알레르기 비염 등 BKC 유해성 정보 제공

4. 연락처

- 산업안전보건연구원 산업화학연구실 연구위원 이용훈
- ☎ (042) 869-8532
- E-mail dvmone@kosha.or.kr

차례

I. 서론	1
1. 연구배경	1
1) 연구필요성	1
2) BKC의 특성	3
3) BKC관련 독성연구	3
2. 연구목표	4
II. 연구방법	5
1. 시험동물 및 시험군 구성	5
2. 혈액학적 검사	5
3. 조직병리학적 검사	5
4. 병리학적 진단검사	6
1) Astra Blue-Vital New Red 염색	6
2) Alcian blue-PAS 염색	6
3) MT(Masson's Trichrome) 염색	7
4) 면역조직화학	8
5. BALF ELISA 검사	9
6. 통계학적 방법	10

III. 연구결과	11
1. 조직병리검사 결과	11
2. 혈액학적 검사 결과	20
3. BALF ELISA 결과	22
4. Astra Blue-Vital New Red 결과	24
5. Alcian blue-PAS 염색 결과	25
6. 비강의 알레르기 반응 관련 면역조직화학 결과	27
1) MUC5AC	27
2) TNF- α	28
3) IL-4	29
4) IL-5	30
5) 비강의 알레르기 반응 관련 표지자 비교	31
7. 산화스트레스 표지자 면역조직화학 결과	32
1) 8-OHdG	32
2) 호흡기계 조직의 산화스트레스 비교	37
8. 세기관지 폐포 연결부 평활근 비대 면역조직화학 결과	38
1) α -SMA	38
2) TGF- β	39
3) 평활근 비대 관련 표지자 비교	40
4) MT 염색	41
IV. 고찰	43
V. 결론	51

VI. 참고문헌	53
Abstract	63

표 차 례

<표 1> 시험군 요약표	5
<표 2> 비강의 조직병리 소견	11
<표 3> 후두 및 기관의 조직병리 소견	13
<표 4> 폐의 조직병리 소견	14

그림 차례

[그림 1] 비강의 조직병리 소견 결과	16
[그림 2] 후두의 조직병리 소견 결과	17
[그림 3] 기관의 조직 병리 소견 결과	18
[그림 4] 폐의 조직 병리 소견 결과	19
[그림 5] 혈액학적 검사 세포수 비교	20
[그림 6] 혈액학적 검사 세포비율 비교	21
[그림 7] BALF IL-4, IL-5, TNF- α ELISA 검사 결과	22
[그림 8] BALF IgE ELISA 검사결과	23
[그림 9] 비강의 Astra Blue-Vital New Red 염색 결과	24
[그림 10] 비강의 Alcian blue-PAS 염색 결과	25
[그림 11] Alcian blue-PAS 염색 정도 비교	26
[그림 12] MUC5AC 면역조직화학 결과	27
[그림 13] TNF- α 면역조직화학 결과	28
[그림 14] IL-4 면역조직화학 결과	29
[그림 15] IL-5 면역조직화학 결과	30
[그림 16] 비강의 알레르기 반응 관련 표지자 면역조직화학 점수 비교 결과	31
[그림 17] 비강의 8-OHdG 면역조직화학 결과	33
[그림 18] 후두의 8-OHdG 면역조직화학 결과	34

[그림 19] 기관의 8-OHdG 면역조직화학 결과	35
[그림 20] 폐의 8-OHdG 면역조직화학 결과	36
[그림 21] 호흡기계조직의 8-OHdG 면역조직화학 점수 비교 결과	37
[그림 22] α -SMA 면역조직화학 결과	38
[그림 23] TGF- β 면역조직화학 결과	39
[그림 24] 평활근 비대 관련 표지자 면역조직화학 점수 비교 결과	40
[그림 25] 폐의 MT염색 결과	41
[그림 26] BKC 호흡기계 독성 기전 모식도	49

I. 서 론

1. 연구 배경

1) 연구 필요성

살생제(biocide)란 곰팡이, 세균, 조류, 곤충, 설치류 등 유해한 생물을 제어 및 제거하기 위한 물질로, EU Regulation No 528/2012 article 3 (1a)[1]에서 살생제를 “사용자에게 단일 물질 또는 혼합물로 제공되며, 단순한 물리적 또는 기계적 수단 외의 방법으로 하나 이상의 활성물질로 구성되거나 활성물질을 발생시켜 해로운 생물을 파괴, 억제, 무해화시키거나, 생물 활동을 억제하거나 조절한다.”로 정의를 하고 있다. 하지만, 이 정의에 해당되는 물질이어도 식물에 사용하는 물질은 살충제로 분류된다.

살생제는 직장이나 가정 등 일상생활에서 광범위하게 사용되고 있다. 보건분야에서는 병원이나 보건 시설에서 미생물을 제어하거나, 감염을 예방하기 위해 방부제나 살균제로 사용되며, 약물 보존제로도 사용된다. 또한, 건축자재, 화장품, 주방세제, 가구, 옷감, 벽지 등 소비재에서도 살생제가 포함되어 있다. 특히, 식품 산업에서 살균제로 광범위하게 사용되는데, 음식이나 음료수 관련된 저장소, 수송, 배관, 기구, 용기 등을 살균하기 위해 사용된다. 축산업에서는 축사나 동물을 소독할 때 사용되며, 상수처리, 하수처리에서는 사용되는데, 염소, 오존, 과산화 염수가 음수처리에 사용된다. 조선업에서도 화물선 등에 살생제 사용이 증가하고 있는데 수송 중 화물을 보호하거나, 다른 나라로부터 곤충이나 해충을 막기 위해 Methyl bromide나 Phosphine 같은 살균제로 훈증처리하며, 조류 등 배의 부착물질을 억제하기 위해서도 사용된다.

살생제는 병원체 뿐만 아니라 비병원체도 죽일 수 있기 때문에 인체에 해롭다.

살생제 중 30% 이상이 내분비 장애를 유발하거나, 수중 생물에 독성 또는 발암성이 있는 것으로 확인되었다. 예를 들어 포름알데하이드는 광범위한 소독제이지만, 피부 자극성을 유발하여 IARC에서 발암성 물질로 분류되어 있다. 근로자들은 작업현장에서 살생제를 사용하여 직접적으로 노출되거나, 살생제를 사용한 옷이나 기구에 접촉하여 간접적으로 노출될 수 있다. 살생제는 주로 흡입이나 피부로 노출될 수 있는데, 흡입노출은 작업현장에서 살생제를 스프레이 형태로 사용하거나 살생제 또는 처리된 물질이 증발하면서 발생할 수 있고, 피부 노출은 물질을 수송, 세척, 저장할 때 일어날 수 있다. 살생제는 임산부, 태아, 어린이, 만성 질환 환자에게 위해성이 특히 있을 수 있으며, 피부, 눈, 호흡기, 신경계 및 다른 기관에 자극을 유발할 수 있다. 또한, 의학, 축산, 식품, 가정에서 살생제 사용이 많아지면서 환경에 노출이 증가하고, 이에 따라 병원성 세균들의 항생제 저항성 증가와 연관이 있는 것으로도 알려져 있다(Schmitz-Felten, 2017).

이러한 살생제에 대한 인체 위험 때문에 미국 EPA(Environmental Protection Agency)는 살생제에 대한 등록제도를 제정하였고, 유럽연합은 REACH (Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of CHemicals)와 연계하여 살생제의 규제를 강화하여 관리를 하고 있다. 국내에는 환경부, 농림수산물식품부, 보건복지부에서 관련법으로 살생제를 관리하는데, 특히, 2019년부터는 환경부에서 ‘생활화학제품 및 살생물제의 안전관리에 관한 법률’과 ‘화학물질의 등록 및 평가 등에 관한 법률’으로 살생제에 대한 관리를 강화하고 있다.

국내에서는 살생제가 가습기 살균제 성분으로 사용되었는데, 2011년에 임산부와 영유아에서 원인불명의 폐질환을 유발하여 사망하는 사건이 발생하여, 살생제가 사회적 문제가 되었다. 가장 많은 사상자를 낸 PHMG와 PGH는 폐질환 원인이 가습기 살균제로 인지 된 시점부터 독성연구를 활발히 진행하고 있으나, 그 외 살생제는 독성 연구가 부족한 실정이다.

가습기 살균제 성분으로 사용되었던 Benzalkonium chloride(BKC)는

2018년도에 산업안전보건연구원에서 13주 아만성 흡입 독성시험을 실시하여 비강 등 호흡기계 장기가 표적장기로 확인되어 NOAEL(No-observed-adverse-effect level, 무영향관찰용량)을 확인하였으나 독성원인을 분석하기 위해서는 독성기전 연구가 필요하다. 따라서, 본 연구는 BKC 흡입독성 시험에서 호흡기계 독성 병리기전을 병리학적 진단기법을 이용하여 확인하고자 한다.

2) BKC의 특성

(1) 물리화학적 성질

BKC는 다양한 짝수 알킬 고리의 알킬벤질디메틸암모늄 클로라이드 혼합물로써, 4 급 암모늄 화합물 구조를 가진 양이온성 계면활성제이다. CAS 번호는 8001-54-5, 화학식은 $(C_6H_5.CH_2N(CH_3)_2R)Cl$ 이며, 밀도는 0.98 g/cm^3 , 인화점 $100\text{ }^\circ\text{C}$, 끓는점은 $100\text{ }^\circ\text{C}$ 이다. 또한, 에탄올과 아세톤에 잘 녹으며, 물에 용해는 되지 않지만 취급이 쉬어 수용성 상태를 선호한다. 용액 상태에서는 약알칼리성이고, 무색 또는 옅은 노랑색의 반고상 물질로 수용액을 흔들면 거품이 나고 쓴맛이 난다.

(2) 용도

BKC는 피부 소독제, 방부제, 보존제, 세정제, 점안제, 이용액, 구강세정제, 위생 및 향균 수건, 샴푸, 화장품, 바닥 청소제, 수술 도구 소독제 및 수포 치료제, 화상 및 궤양 치료제, 살조제, 섬유 유연제, 세탁제로 광범위하게 사용된다.

3) BKC관련 독성연구

BKC는 사람 기관지 상피 세포주(BEAS-2B)에서 세포 및 유전독성이 확인되었으며(Deuschle et al., 2006), BKC는 랫드에서 경구 또는 정맥으로

투여 시 폐에 염증 및 폐수종 유발한다(Xue et al, 2004). 또한, 사람 결막세포에서 BKC가 산화적 스트레스를 유발하는 것으로 알려져 있으며(Debbasch et al., 2001), 알레르기성 접촉 피부염을 유발하는 것으로도 알려져 있다(Orsini et al., 2018). BKC 랫드 단회 노출 시험에서 BALF IgE가 증가하는 알레르기 증상이 확인되었으며(Swiercz et al., 2008), BKC 랫드 13주 아만성 시험에서 비강의 호산구 침윤 및 점액 분비 과다 및 혈액에서 호산구 증가 등 알레르기 비염 유사증상이 확인되었다(서동석, 2019).

2. 연구 목표

본 연구에서는 BKC 90일 아만성 시험의 시료에서 병리진단기법을 이용하여 알레르기 비염, 산화스트레스, 세기관지 폐포 연결부 평활근 비대가 유발되는 호흡기계 독성기전을 확인하고, 이를 이용하여 BKC 취급 근로자 및 소비자에게 유용한 정보를 제공하고자 한다.

II. 연구 방법

1. 시험동물 및 시험군 구성

본시험에서는 특정병원체 부재(SPF) 동물인 수컷 Fischer 344 랫드(Japan SLC, Inc., Hamamatu, Shizuoka, Japan) 7주령으로 수행되었다. 각 군당 동물 수는 10마리로 설정하여, 대조군($0\text{mg}/\text{m}^3$)과 BKC군($1.80\text{ mg}/\text{m}^3$)으로 구성하여 BKC를 노출하였다. 노출은 산업현장에서 노출환경과 유사하도록 일일 6시간, 주 5일간, 전신흡입노출 방법으로 13주간 노출하였다(표 1).

<표 1> 시험군 요약표

Group	Dose (mg/m^3)	No. of Animals
Control	0	10
BKC	1.8	10

2. 혈액학적 검사

시험동물로부터 3ml 이상의 혈액을 복대동맥에서 채혈하였다. 채취한 혈액 중 약 1ml는 EDTA가 함유된 튜브에 채취한 후 혈구분석기(ADVIA 2120i, SIEMENS, Frankfurt, Germany)로 백혈구 총수와 호중구, 호산구, 호염구, 단핵구, 림프구의 총수와 비율을 측정하였다.

3. 조직병리학적 검사

부검 시 시험동물에서 비강, 후두, 기관, 폐를 적출하여 10% 중성 완충 포르말린에 고정하였다. 폐는 기관을 통하여 10% 중성 완충 포르말린 8ml를 주입하여 관류 고정한다. 그 다음 표준 조직병리SOP에 따라 자동조직전처리기를 이용하여 삭정, 탈수, 투명화, 침투의 조직전처리 과정을 이용하여 실시하였다. 그리고 전처리된 조직을 파라핀 포매를 하여 파라핀 블록을 제작한 다음, 약 3-4 μm 로 미세박절하여 Hematoxylin & eosin 염색을 하여 슬라이드를 제작하였다. 제작된 슬라이드는 광학현미경(Scope A1, Zeiss, Oberkochen, Germany)으로 검경과 사진촬영을 하였다. 검경 결과는 다음 같은 기준으로 평가하였다. Minimal: 미미한, Mild: 경도, Moderate: 중증도, Marked: 심한

4. 병리학적 진단검사

1) Astra Blue-Vital New Red 염색

대조군과 BKC군에서 5마리 씩 선별을 한다. 슬라이드를 100% Xylene 2회, 100% Ethanol 2회, 70% Ethanol 1회, 50% Ethanol 1회 처리하여 탈수시킨 다음 DW(Distilled water)에 담근다. 그 다음 Astra blue 용액을 3 분 동안 염색한 후 DW로 행군다. 그 다음 Vital New red 용액을 30분 동안 처리한 후 DW로 행군다. 그 다음 Mayer's hematoxylin에 30초 동안 염색한 후 흐르는 수돗물에 2분 동안 수세하고, 증류수에 담근다. 그 다음 50% Ethanol 1회, 70% Ethanol 1회, 100% Ethanol 2회, 100% Xylene 2회 처리하여 탈수한 다음 커버 슬라이드로 봉입한다.

2) Alcian blue-PAS 염색

대조군과 BKC군에서 5마리 씩 비강 슬라이드를 선별을 한다. 100% Xylene 2회, 100% Ethanol 2회, 70% Ethanol 1회, 50% Ethanol 1회 씩 처리하여

탈수시킨 후 DW에 처리한다. 그리고 Alcian blue에 15분 동안 염색한 후 흐르는 수돗물에 2분간 처리 후 DW로 행군다. 그 후 Periodic acid에 5분 간 처리한 다음 DW로 행군다. 그리고 Schiff's reagent에 10분 동안 염색 한 후 5분 간 흐르는 수돗물에 담근다. 그 후 Hematoxylin으로 1분 간 염색하고 흐르는 수돗물에 2분 동안 담근 다음, 3% acid alcohol로 분별을 한다. 그리고 Scott's bluing으로 처리를 한 후, 흐르는 수돗물에 수세한다. 그 다음 50% Ethanol 1회, 70% Ethanol 1회, 100% Ethanol 2회, 100% Xylene 2회 씩 처리하여 탈수한 다음 슬라이드를 커버슬라이드로 봉입한다. 완료된 슬라이드는 광학현미경 (Scope A1, Zeiss, Oberkochen, Germany)을 이용하여 400 배율에서 10 시야를 선택하여 다음과 같은 기준으로 검경하여 평균을 산출하였다. 0: No Staining, 1: Minimal, 2: Mild, 3: Moderate, 4: Intense

3) MT(Masson's Trichrome) 염색

대조군과 BKC군에서 5마리 씩 폐 슬라이드를 선별을 한다. 60°C 오븐에서 폐 조직 슬라이드를 20분 간 전처리를 한다. 100% Xylene 2회, 100% Ethanol 2회, 70% Ethanol 1회, 50% Ethanol 1회 처리하여 탈수시킨 후 DW로 세척한다. 미리 가열한 Bouin's Fluid를 슬라이드에 60분 동안 처리한다. 수돗물로 슬라이드가 깨끗해질 때까지 수세한 다음 DW로 행군다. Weigert's Iron Hematoxylin으로 10분간 염색을 실시한다. 그 후 흐르는 수돗물에서 2분 간 수세한 후 DW로 수세한다. 그 다음 Biebrich Scarlet-Acid Fuchsin 용액을 10분 동안 슬라이드에 처리한 다음, DW로 슬라이드를 수세한다. 그리고 Phosphomolybdic/Phosphotungstic Acid 용액으로 처리한 다음 수세하지 않고, 슬라이드를 Aniline Blue 용액으로 10분 동안 처리한 후 DW로 수세한다. 그리고 1% Acetic Acid 용액으로 5분간 슬라이드를 처리한다. 그 후 50% Ethanol 1회, 70% Ethanol 1회, 100% Ethanol 2회, 100% Xylene 2회 처리하여

탈수시킨 후 커버 슬라이드로 봉입한다.

4) 면역조직화학

알레르기 반응을 확인하기 위해서 Mucin 5AC(MUC5AC), Interleukins-4 (IL-4), Interleukins-5(IL-5), Tumor necrosis factor- α (TNF- α), 산화스트레스 반응을 확인하기 위하여 8-Hydroxydeoxyguanosine(8-OHdG), 폐 조직에서 세기관지 폐포 평활근 비대를 확인하기 위하여 Transforming growth factor- β (TGF- β), α -Smooth muscle actin(α -SMA)을 면역조직화학을 이용하여 확인하였다. 본 시험에서 사용한 일차 항체는 다음과 같다. 1) Rabbit anti-MUC5AC antibody(Bioss, Woburn, MA, USA, 1:200), 2) Rabbit anti-polyclonal TNF- α antibody(Abcam, Cambridge, UK, 1:100), 3) Rabbit anti-polyclonal IL-4 antibody(Biorbyt, Cambridge, UK, 1:100), 4) Rabbit anti-polyconal IL-5(Bioss, Woburn, MA, USA, 1:100), 5) Rabbit anti-8-OHdG(Bioss, Woburn, MA, USA, 1:600), 6) Mouse anti-monoclonal α -SMA antibody(Sigma-Aldrich Co. LLC., Darmstadt, Germany, 1:100), 7) Rabbit anti-polyclonal TGF- β antibody(Abcam, Cambridge, UK, 1:200)

대조군과 BKC군에서 5마리 씩 비강 슬라이드를 선별을 한다. 슬라이드를 60°C 오븐에서 20분 동안 가열한다. 전처리가 완료되면 슬라이드를 100% Xylene 2회, 100% Ethanol 2회, 70% Ethanol 1회, 50% Ethanol 1회 처리하여 탈수 시킨 다음 1분 동안 DW에 행군 다음, PBS에서 5분 동안 수세한다. 그 후 0.1M citric acid buffer에서 슬라이드를 10분 동안 끓인다. 용액이 식은 후 5분 동안 슬라이드를 Phosphate-buffered saline(PBS)에 수세하고 3% H₂O₂에서 10분간 처리한 그 다음 PBS with Tween 20(PBST)에서 슬라이드를 5분간 수세하고 상온에서 Universal power block으로 처리한다. 그 후 일차항체를 슬라이드에 처리하여, 4°C에서 하룻밤 동안 반응시킨다. 다음날 슬라이드를 PBST에서 2번 수세하고 Horseradish peroxidase(HRP)와 결합된 2차 항체를 반응 시킨다. 그

다음 PBS로 5분 간 수세한 후 3,3'-diaminobenzidine(DAB)로 발색을 시킨다. 그 후 DW로 5분 동안 수세한다. 그리고 Mayer hematoxylin에서 30초 동안 염색한 다음 흐르는 수돗물에서 5분 동안 수세하고 DW에 1분 동안 담근다. 그 다음 50% Ethanol 1회, 70% Ethanol 1회, 100% Ethanol 2회, 100% Xylene 2회 처리하여 탈수시킨 다음 커버슬라이드로 봉입한다. 면역염색 정도는 광학현미경(Scope A1, Zeiss, Oberkochen, Germany) 를 이용하여 200배율에서 각 슬라이드에서 10시야를 선택해 다음과 같이 평가한다. 0: No Staining, 1: Minimal, 2: Mild, 3: Moderate, 4: Intense

5. BALF ELISA 검사

기관지폐포 세척액(Bronchoalveolar lavage fluid, BALF)에서 알레르기 반응 유도 사이토카인인 IL-4, IL-5, TNF- α , IFN- γ , IgE 를 확인하기 위하여 ELISA를 실시하였다. 해당 사이토카인은 Rat IL-4 ELISA, Rat TNF- α ELISA, Rat IgE ELISA(Koma biotech. Inc., Seoul, Korea) 및 Rat IL-5 ELISA Kit(Genorise, Glen Mills, PA, USA)를 이용하여 실시하였다.

IL-4, TNF- α , IgE는 다음과 같은 방법으로 측정하였다. 세척용액을 각 well에 200 μ l씩 분주한다. 용액을 제거한 다음 Plate를 각 well에 300 μ l 세척용액으로 3번 수세한다. 그리고 표준용액 및 샘플용액을 각 well에 100 μ l 씩 분주한다. Plate를 커버로 덮고 상온에서 120분 동안 반응시킨다. 용액을 제거한 다음 Plate를 각 well 당 300 μ l 세척용액으로 4번 수세한다. 희석된 Detection antibody (0.5 μ g/1ml)를 각 well 당 100 μ l로 처리한다. 그 후 Plate를 커버로 덮고 상온에서 120분 동안 반응시킨다. 용액을 제거하고 Plate를 각 well 당 300 μ l 세척용액으로 4번 수세한다. 각 well 당 1:20 희석된 발색효소 100 μ l 씩 처리한 다음 Plate를 커버로 덮고 상온에서 30분 동안 반응시킨다. 그 시약을 제거하고 Plate를 각 well 당 세척용액 300 μ l로 4번 수세한다. 그리고 발색용액으로 각 well 당 100 μ l

씩 분주 한 후 1-11 분 동안 처리한 다음 정지 용액으로 각 well 당 $100\mu\text{l}$ 씩 분주한다. 그 다음 마이크로플레이트 리더기(Synergy H1, Biotek, San Jose, CA, USA)를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하여 OD(Optical density)를 확인하였다.

IL-5 ELISA는 다음과 같은 방법을 측정하였다. 희석된 IL-5 표준용액과 샘플을 0.1ml 씩 Plate에 분주한다. 그리고 Plate를 커버로 덮고 상온에서 60분 동안 처리한 다음 샘플을 제거한 다음 1x assay buffer로 처리 한다. 그 다음 Working detection antibody를 0.1ml 씩 분주한다. 그리고 Plate를 커버로 덮고 상온에서 60 분간 반응시킨다. 그 다음 Plate에서 샘플을 제거한 후 1x assay buffer로 2회 수세하고 Working HRP conjugate를 0.1ml 씩 분주한다. 그리고 Plate를 커버로 덮고 상온에서 20분 동안 반응 시킨다. 그 다음 Plate에 용액을 제거한 다음 1x assay buffer로 2회 수세하고 기질 용액으로 0.1ml 씩 각 well에 분주한 후 Plate를 커버로 덮고 상온에서 5-20분 동안 반응시킨다. 그 다음 정지용액을 0.1ml 씩 각 well에 분주한다. 그리고, 마이크로플레이트 리더기에서 흡광도 450nm로 OD값을 측정한다.

6. 통계학적 방법

통계학적 결과는 평균 과 표준편차로 나타냈으며, SPSS (version 18, IBM, Armonk, NY, USA)를 이용하여 분석을 하였다. 혈액 및 ELISA는 Levene test로 등분산성을 검정하여 후 등분산인 경우 모수적 방법인 독립표본 T 검정으로 집단 간 평균의 차이를 검정하였다. 단, Alcian blue-PAS 염색, 면역조직화학 점수의 통계처리는 비모수적 순위척도 방법 인 Mann-Whitney U test를 이용하여 실시하였다.

Ⅲ. 연구 결과

1. 조직병리검사 결과

BKC군에서 호흡상피의 점액세포 비대 및 과다형성(Hypertrophy/hyperplasia, mucous cells), 이행상피의 점액세포 화생(Metaplasia, mucous cells, transitional epithelium), 호흡상피의 호산성 소구(Eosinophilic globules, respiratory epithelium) 및 후각상피의 호산성 소구/결정(Eosinophilic globules/crystals, olfactory epithelium)이 관찰되었다. 또한, 호흡상피의 과다형성(Hyperplasia), 고유판의 호산구 침윤(Infiltration, eosinophil, lamina propia), 후각상피의 위축(Atrophy, olfactory epithelium)이 관찰되었다(그림 1). 소견의 정도와 빈도는 아래 표 2에 나타내었다.

<표 2> 비강의 조직병리 소견

Organ	Histopathologic findings	Group/Dose(mg/m ³)	
		Control/0	BKC/1.8
	Number examined	10	10
N a s a l cavity	Hypertrophy/hyperplasia, mucous cells, respiratory epithelium		
		Minimal	0
		Mild	0
		Moderate	5
		Marked	5
	Total Finding Incidence	0	10
	Hyperplasia, respiratory epithelium		
		Minimal	0
		Mild	0
		Moderate	7
		Marked	3

Total Finding Incidence	0	10
Metaplasia, mucous cells, transitional epithelium		
Minimal	0	0
Mild	0	0
Moderate	0	5
Marked	0	5
Total Finding Incidence	0	10
Eosinophilic globules, respiratory epithelium		
Minimal	0	0
Mild	0	1
Moderate	0	6
Marked	0	3
Total Finding Incidence	0	10
Eosinophilic globules/crystals, olfactory epithelium		
Minimal	0	0
Mild	0	0
Moderate	0	0
Marked	0	10
Total Finding Incidence	0	10
Infiltration, eosinophil, lamina propia		
Minimal	0	2
Mild	0	6
Moderate	0	2
Total Finding Incidence	0	10
Atrophy, olfactory epithelium		
Minimal	0	2
Total Finding Incidence	0	2

후두에서 BKC 노출군에서 상피의 편평상피 화생(Squamous metaplasia, epithelium), 상피의 과다형성(Hyperplasia, epithelium), 호흡상피의 점액세포 비대 및 과다형성 상피 위축 및 고유판의 호산구 침윤이 관찰되었다(그림 2).

또한, 기관에서는 BKC 노출군에서 상피의 과다형성, 상피의 점액세포 비대 및 과다형성 및 상피 위축이 관찰되었다(그림 3). 소견의 정도와 빈도는 아래 표 3에 나타내었다.

<표 3> 후두 및 기관의 조직병리 소견

Organ	Histopathologic findings	Group/Dose(mg/m ³)	
		Control/0	BKC/1.8
Larynx	Number examined	10	10
	Squamous metaplasia, epithelium		
	Minimal	0	4
	Mild	0	3
	Moderate	0	2
	Total Finding Incidence	0	9
	Hyperplasia, epithelium		
	Minimal	0	4
	Mild	0	5
	Moderate	0	1
	Total Finding Incidence	0	10
	Hypertrophy/hyperplasia, mucous cells, epithelium		
	Minimal	0	5
	Mild	0	1
	Total Finding Incidence	0	6
	Atrophy, epithelium		
	Minimal	0	3
	Mild	0	5
	Total Finding Incidence	0	8
	Infiltration, eosinophil, lamina propia		
	Minimal	0	4
	Total Finding Incidence	0	4
Trachea	Hyperplasia, epithelium		
	Minimal	0	0

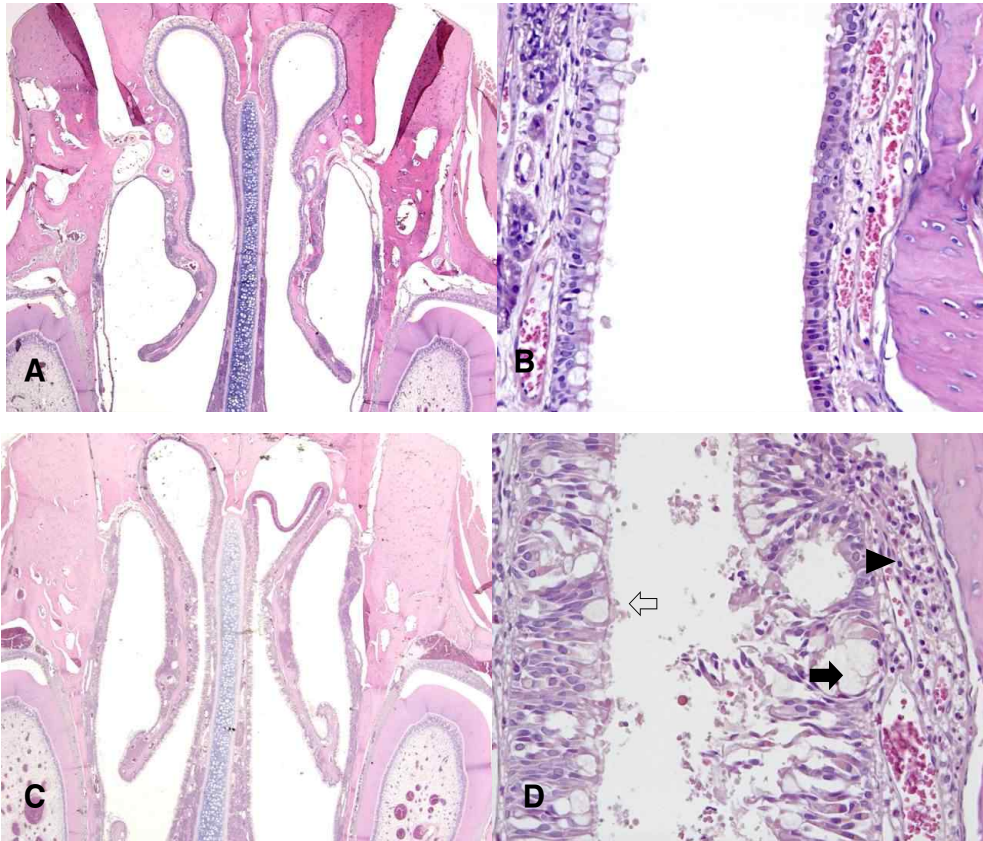
	Mild	0	0
	Moderate	0	4
	Marked	0	6
Total Finding Incidence		0	10
Hypertrophy/hyperplasia, mucous cells, respiratory epithelium			
	Minimal	0	2
Total Finding Incidence		0	2
Atrophy, epithelium			
	Minimal	0	1
Total Finding Incidence		0	1

BKC 노출군에서 세기관지 폐포 연결부의 평활근 비대(Smooth muscle hypertrophy, bronchioloalveolar junction), 종말 세기관지 상피의 위축, 변성 및 재생(Atrophy/degeneration/regeneration, terminal bronchiolar epithelium), 기관지 및 세기관지의 점액세포 비대 및 과다형성(Hypertrophy/hyperplasia, mucous cells, bronchial/bronchiolar), 혈관주위의 호산구 침윤(Infiltration, eosinophil, perivascular) 및 세기관지 폐포 연결부의 염증세포 침윤(Infiltration, inflammatory, bronchioloalveolar junction)이 관찰되었다. 또한, 세기관지 상피의 호산성 소구(Eosinophilic globules, bronchiolar epithelium)이 관찰되었다(그림 4). 소견의 정도와 빈도는 아래 표 4에 나타내었다.

<표 4> 폐의 조직병리 소견

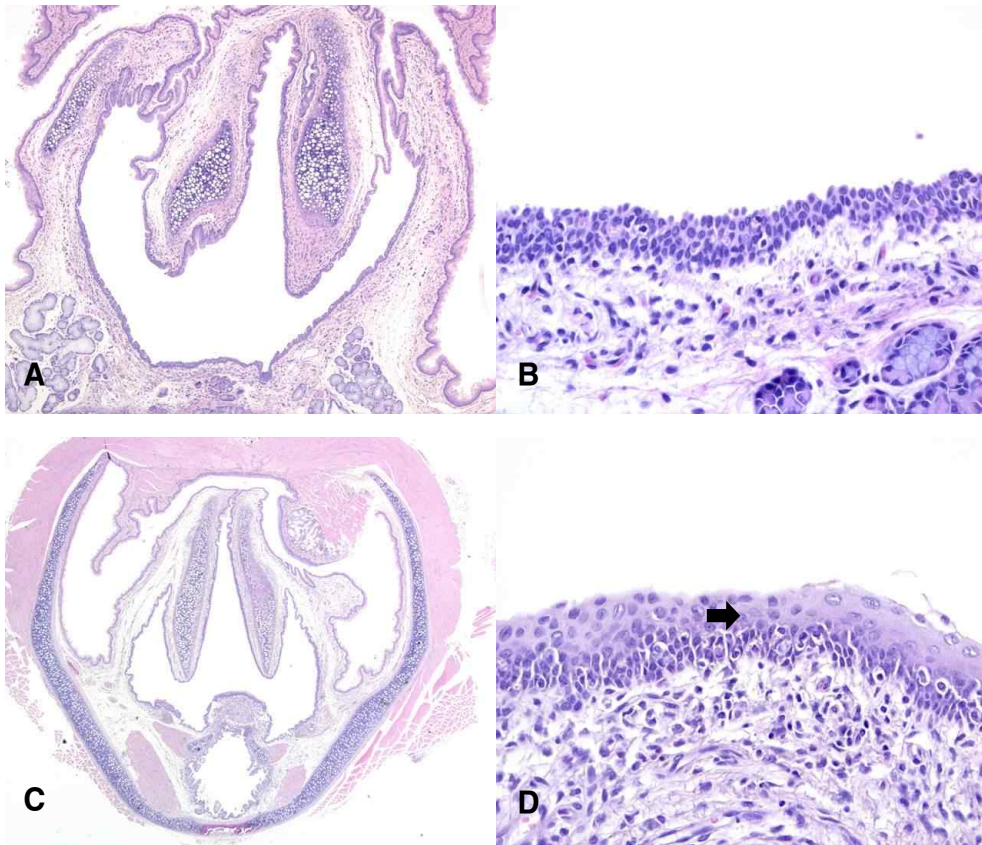
Organ	Histopathologic findings	Group/Dose(mg/m ³)	
		Control/0	BKC/1.8
	Number examined	10	10
Lung	Smooth muscle hypertrophy, bronchioloalveolar junction		
	Minimal	0	4
	Mild	0	4
	Moderate	0	2
	Total Finding Incidence	0	10

Atrophy/degeneration/regeneration, bronchiolar epithelium	terminal		
	Minimal	0	6
	Mild	0	4
Total Finding Incidence		0	10
Hypertrophy/hyperplasia, bronchial/bronchiolar	mucous cells,		
	Minimal	0	4
	Mild	0	6
Total Finding Incidence		0	10
Eosinophilic globules, bronchiolar epithelium			
	Minimal	0	4
Total Finding Incidence		0	4
Infiltration, eosinophil, perivascular			
	Minimal	0	5
Total Finding Incidence		0	5
Infiltration, inflammatory, bronchioloalveolar junction			
	Minimal	0	2
Total Finding Incidence		0	2



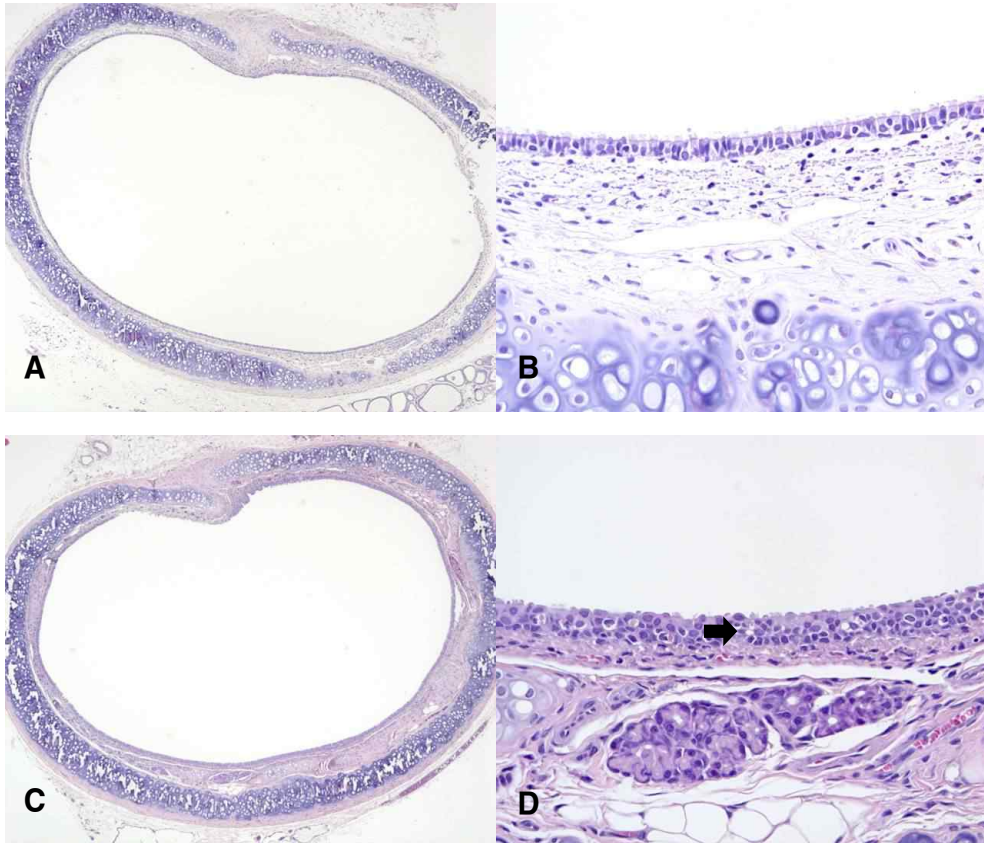
[그림 1] 비강의 조직병리 소견 결과

A), B) 비강에서 특이적인 소견은 관찰되지 않았다. 대조군, C), D) 비강에서 점액세포 비대 및 과다증식(화살표) 및 호흡상피 과다증식(흰화살표), 고유판의 호산구 침윤(화살표머리)가 관찰되었다. BKC군, 각 50배, 400배, HE.



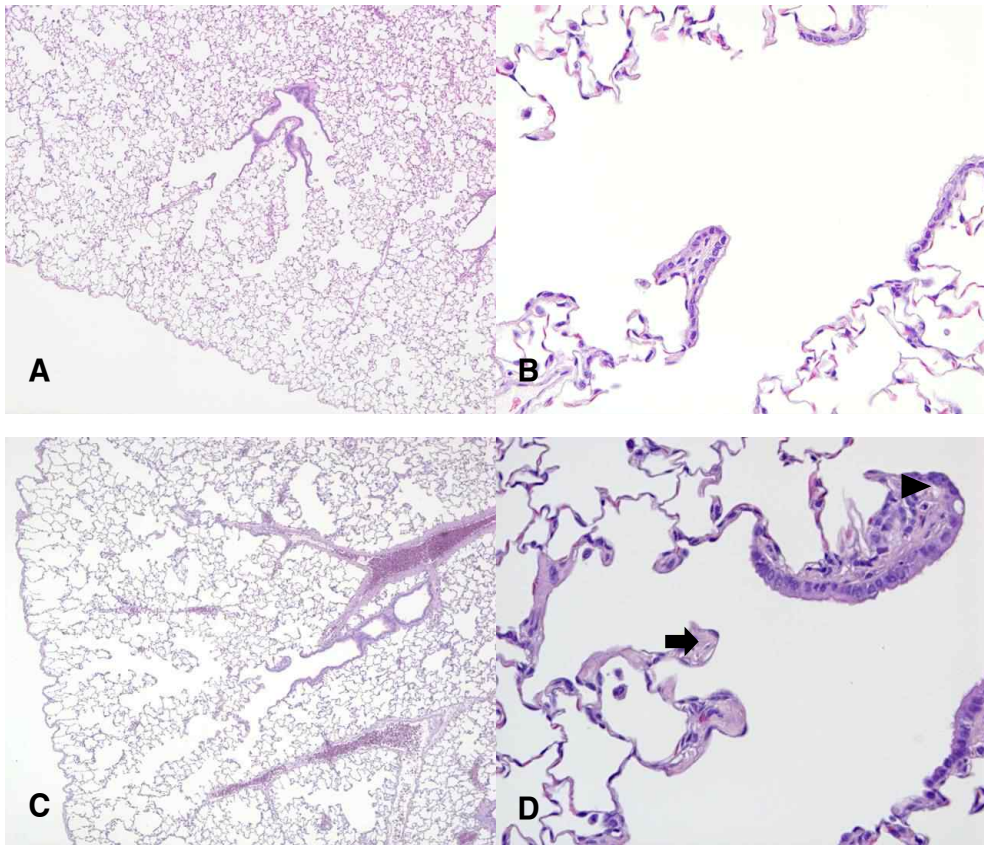
[그림 2] 후두의 조직병리 소견 결과

A), B), 후두에서 특이적인 소견은 관찰되지 않았다. 대조군, C), D) 후두의 상피에서 편평상피 화생(화살표)가 관찰되었다. BKC군, 각 50배, 400배, HE.



[그림 3] 기관의 조직 병리 소견 결과

A), B), 기관에서 특이적인 소견은 관찰되지 않았다. 대조군, C), D) 기관에서 상피과다형성(화살표)가 관찰되었다. BKC군, 각 50배, 400배, HE.

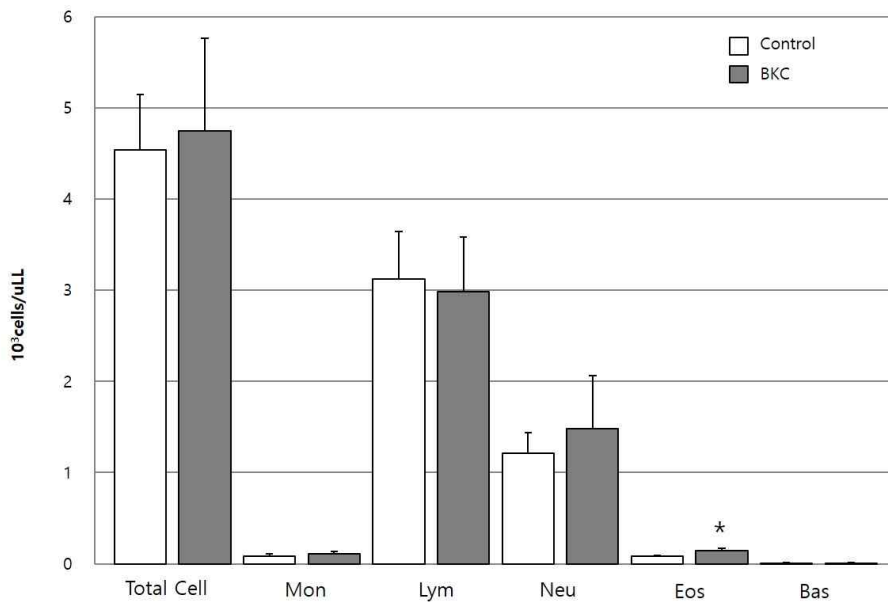


[그림 4] 폐의 조직 병리 소견 결과

A), B), 폐에서 특이적인 소견은 관찰되지 않았다. 대조군, C), D) 폐에서 세기관지 폐포 연결부의 평활근 비대(화살표) 및 종말 세기관지 상피의 재생(화살표머리)이 관찰되었다. BKC군, 각 50배, 400배, HE.

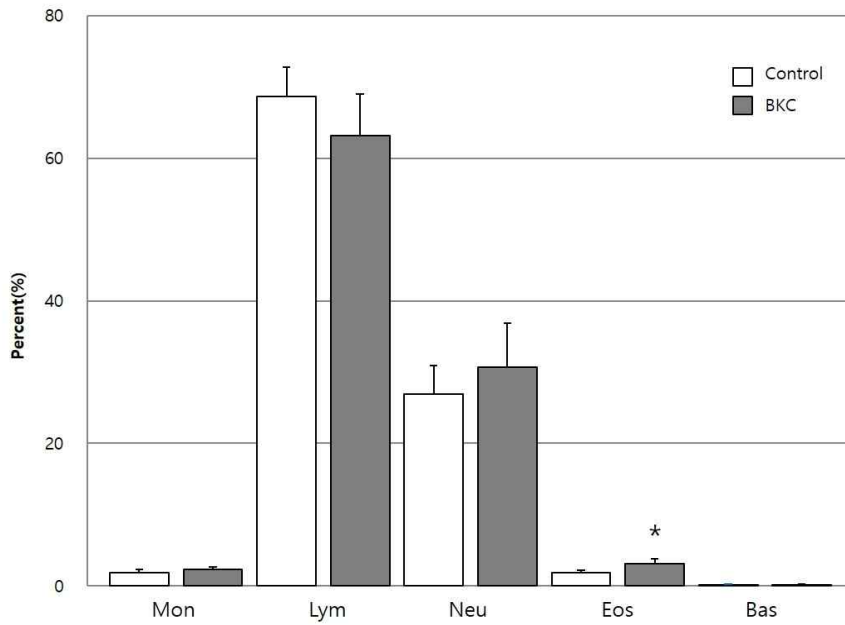
2. 혈액학적 검사 결과

대조군과 비교하여 BKC군에서 호산구 수 및 호산구 비율의 유의한 증가가 관찰되었다(그림 5 및 6).



[그림 5] 혈액학적 검사 세포수 비교

대조군과 유의성 있게 차이 있음 : * $p < 0.05$

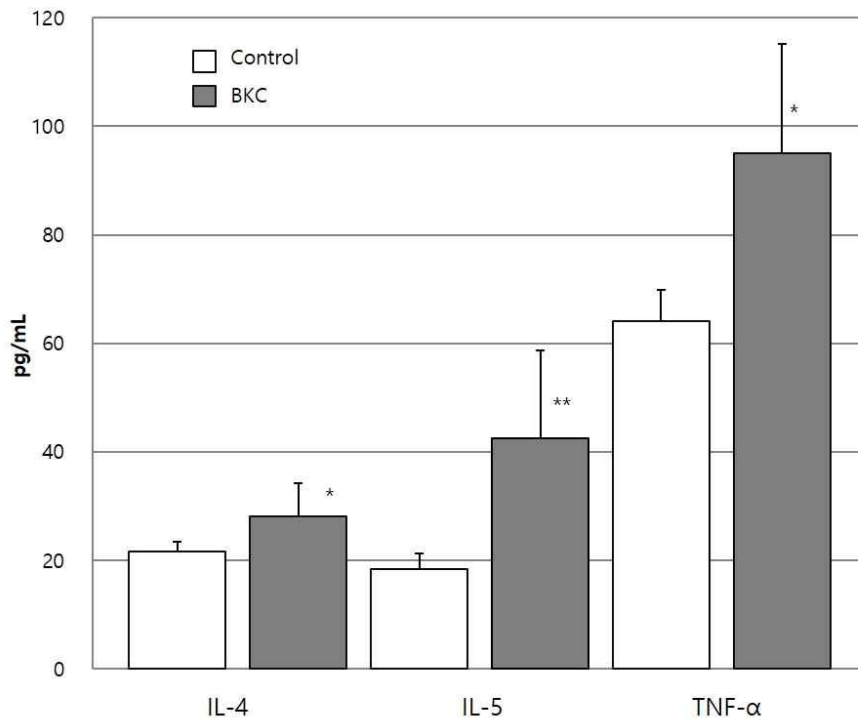


[그림 6] 혈액학적 검사 세포비율 비교

대조군과 유의성 있게 차이 있음 : * $p < 0.05$

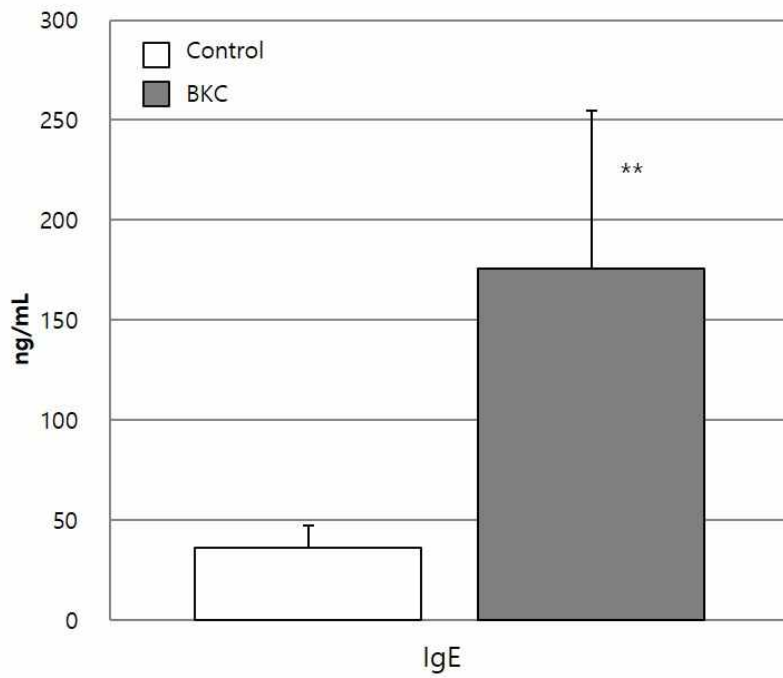
3. BALF ELISA 결과

IL-4, IL-5, TNF- α , IgE 모두 대조군에 비교하여 BKC군의 유의한 증가가 확인되었다(그림 7 및 8).



[그림 7] BALF IL-4, IL-5, TNF- α , ELISA 검사 결과

대조군과 유의성 있게 차이 있음 : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

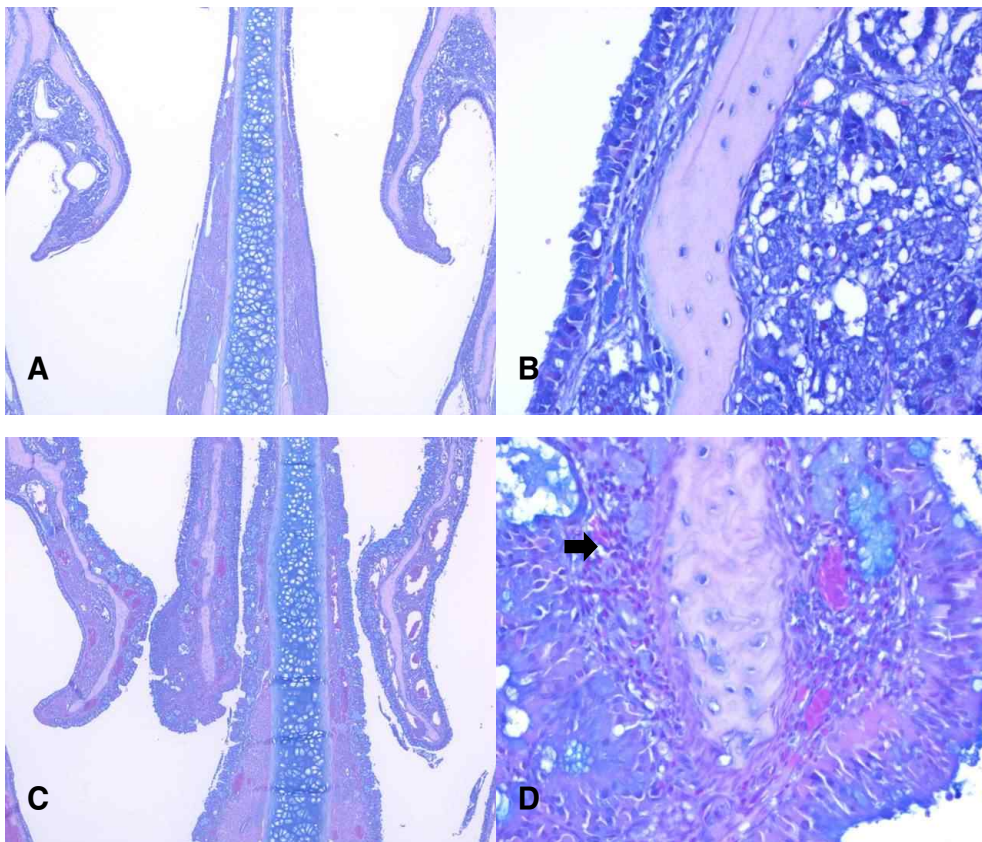


[그림 8] BALF IgE ELISA 검사 결과

대조군과 유의성 있게 차이 있음 : ** $p < 0.01$

4. Astra Blue-Vital New Red 결과

BKC군은 비강 고유판에서 호산구의 세포질이 자주색으로 염색이 되었다. 그 외에 대조군과 BKC군은 모두 골 조직은 분홍색, 결합조직 성분은 파란색으로 염색이 되었다(그림 9).

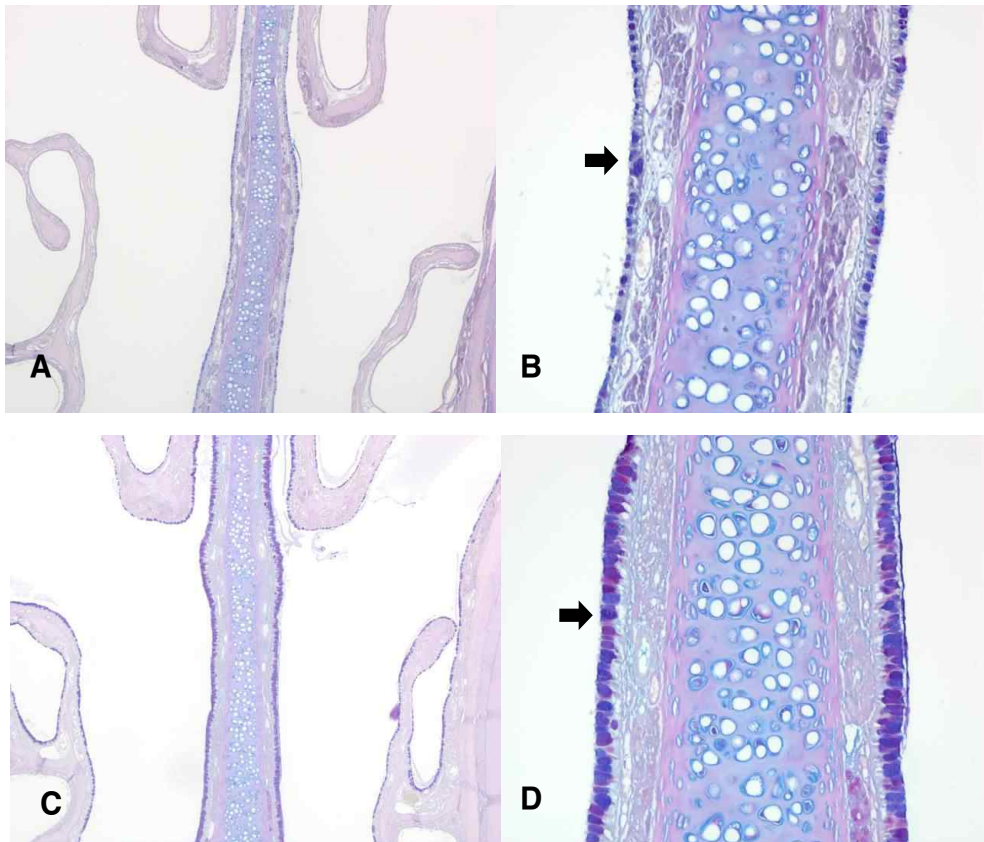


[그림 9] 비강의 Astra Blue-Vital New Red 염색 결과

A), B) 비강에서 특이 반응은 관찰되지 않았다. 대조군, C), D) 비강 고유판에서 호산구의 세포질이 자주색으로 염색이 되었다(화살표). BKC군, 각 50배, 400배, Astra Blue-Vital New Red.

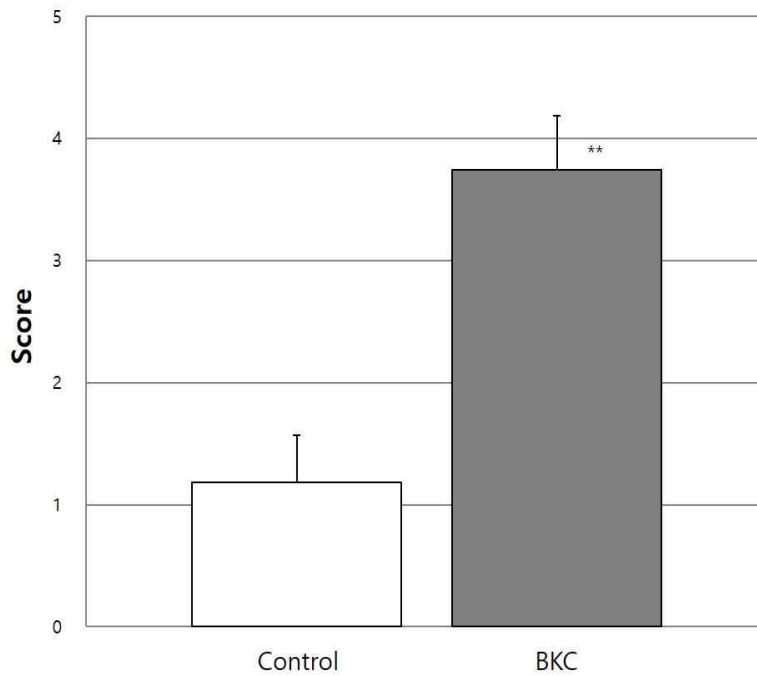
5. Alcian blue-PAS 염색 결과

비강 점막의 호흡상피의 점액세포에서 점액이 대부분 청색으로 염색되었다. 대조군과 비교하여 BKC군은 점액세포가 커지고 수가 증가하였다. 염색정도는 대조군에서 비교하여 BKC군이 유의하게 증가하였다(그림 10 및 11).



[그림 10] 비강의 Alcian blue-PAS 염색 결과

A), B) 비강에서 점액세포(화살표)가 청색으로 염색되었다, 대조군, C), D) 비강에서 점액세포(화살표)가 커지고 수가 증가하였다. BKC군, 각 50배, 200배, Alcian Blue-PAS.



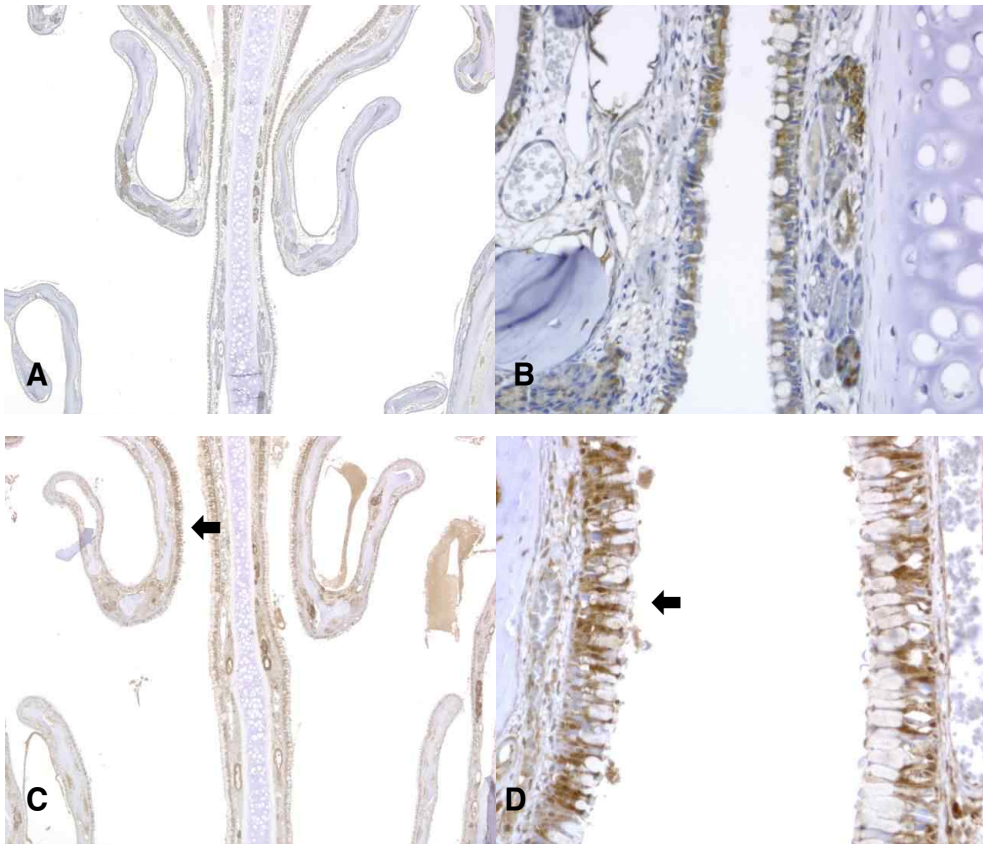
[그림 11] Alcian blue-PAS 염색 정도 비교

대조군과 유의성 있게 차이 있음 : ** $p < 0.01$,

6. 비강의 알레르기 반응 관련 면역조직화학 결과

1) MUC5AC

MUC5AC는 대조군에서 양성반응이 미미하게 관찰되었으나, BKC군에서는 호흡상피의 점액세포에서 주로 강한 양성 반응이 관찰되었다(그림 12).

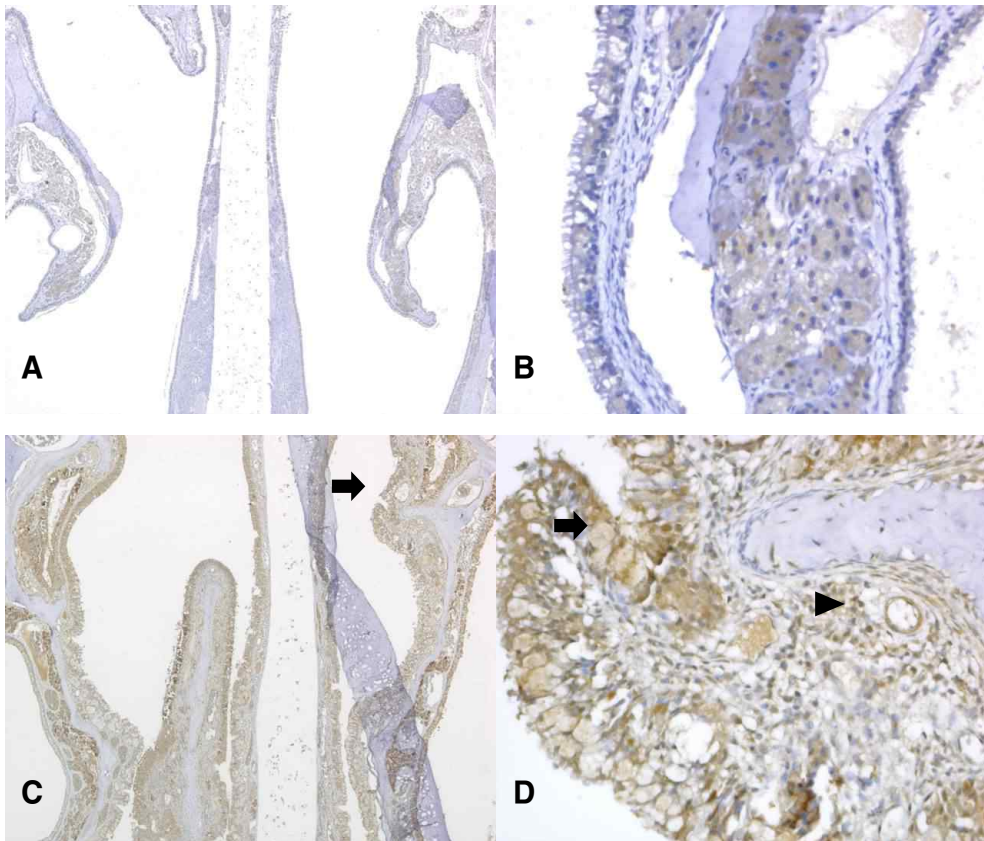


[그림 12] MUC5AC 면역조직화학 결과

A), B) 비강에서 특이적인 반응은 확인되지 않았다. 대조군, C), D) 비강의 호흡상피의 점액세포(화살표)에서 양성반응이 강하게 관찰되었다. BKC군, 각 50배, 400배, IHC.

2) TNF- α

TNF- α 는 대조군에서 양성반응이 미미하게 관찰되었으나, BKC군에서는 호흡상피의 점액세포 비대 및 과다형성, 호흡상피 과다형성 및 고유판의 호산구 등 염증세포에서 주로 강한 양성 반응이 관찰되었다(그림 13).

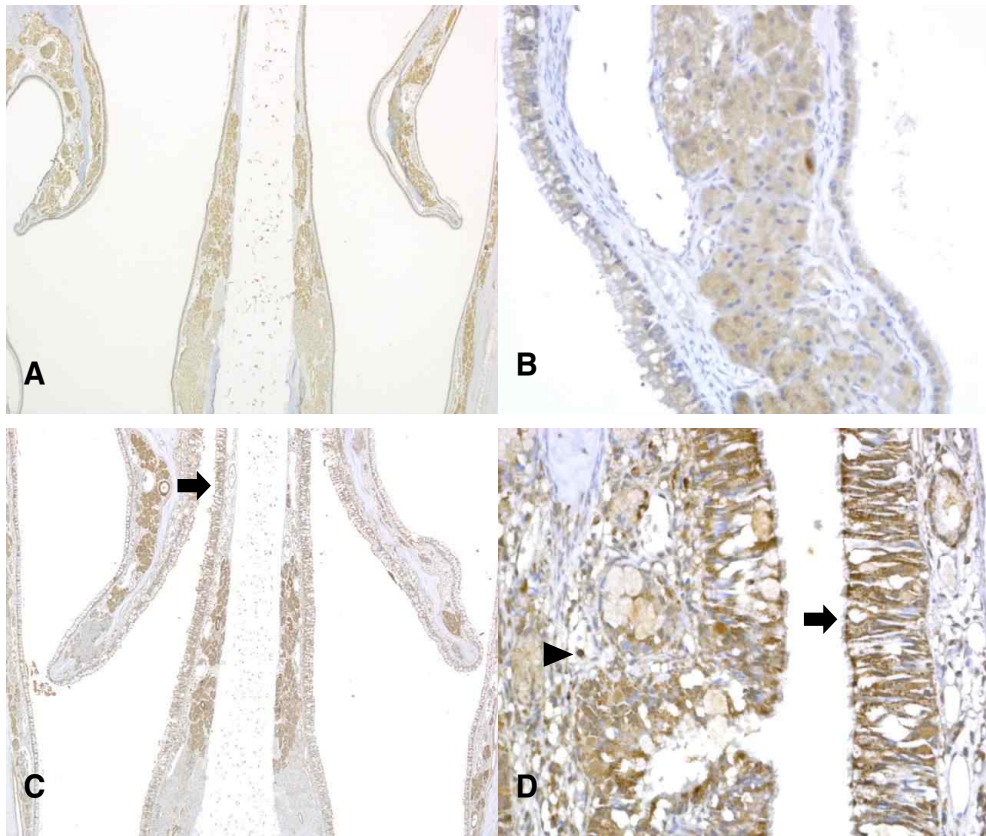


[그림 13] TNF- α 면역조직화학 결과

A), B) 비강에서 특이적인 반응은 확인되지 않았다. 대조군, C), D) 비강의 호흡상피의 점액세포 비대 및 과다형성의 점액세포(화살표) 및 고유판의 염증세포(화살표머리)에서 양성반응이 강하게 관찰되었다. BKC군, 각 50배, 400배, IHC.

3) IL-4

IL-4는 대조군에서 양성반응이 미미하게 관찰되었으며, BKC군에서는 호흡상피의 점액세포 비대 및 과다형성, 호흡상피 과다형성 및 고유판의 호산구 등 염증세포에서 주로 강한 양성 반응이 관찰되었다(그림 14).

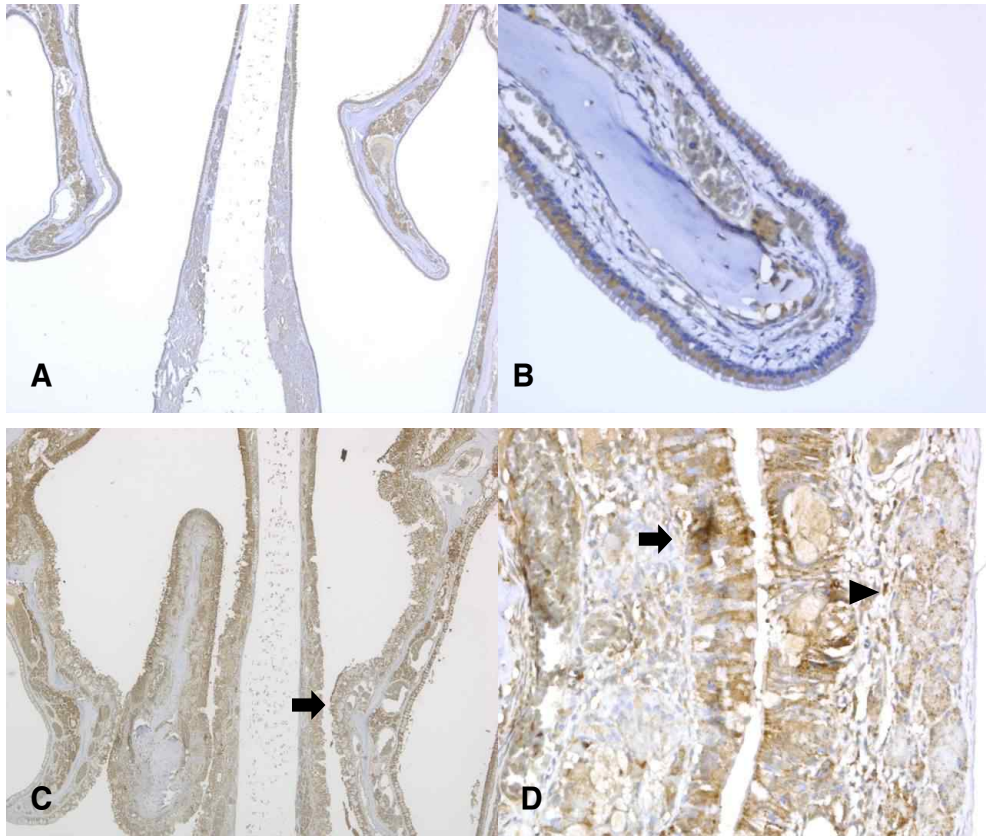


[그림 14] IL-4 면역조직화학 결과

A), B) 비강에서 특이적인 반응은 확인되지 않았다. 대조군, C), D) 비강의 호흡상피의 과다형성(화살표) 및 고유판의 염증세포(화살표머리)에서 주로 양성반응이 강하게 관찰되었다. BKC군, 각 50배, 400배, IHC.

4) IL-5

IL-5는 대조군에서 호흡상피에서 양성반응이 미미하게 관찰되었으나, BKC군에서는 호흡상피의 점액세포 비대 및 과다형성, 호흡상피 과다형성 및 고유관의 호산구등 염증세포에서 주로 강한 양성 반응이 관찰되었다.(그림 15).

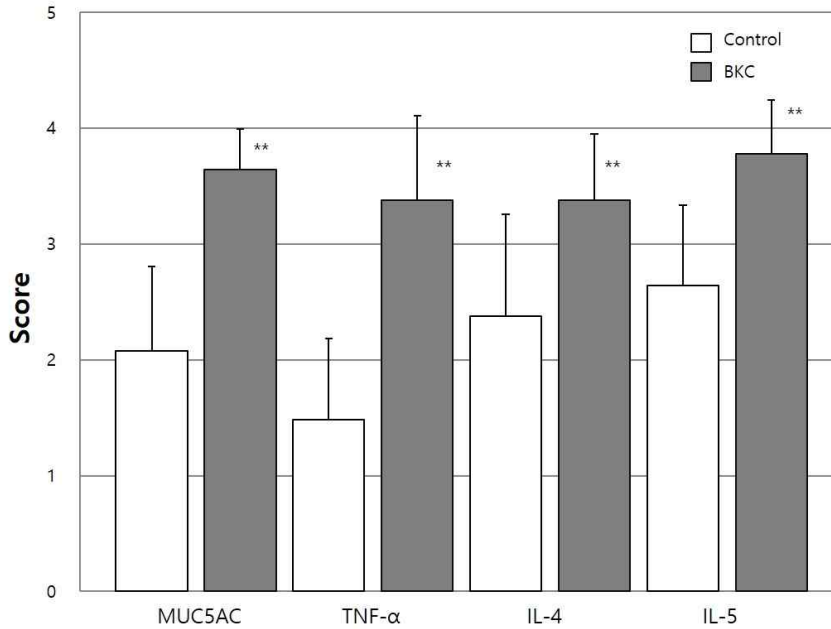


[그림 15] IL-5 면역조직화학 결과

A), B) 비강에서 특이적인 반응은 확인되지 않았다. 대조군, C), D) 비강의 호흡상피의 과다형성(화살표) 및 고유관의 염증세포(화살표머리)에서 양성반응이 강하게 관찰되었다, BKC군, 각 50배, 400배, IHC.

5) 비강의 알레르기 반응 관련 표지자 비교

비강에서 알레르기 반응 마커인 MUC5AC, TNF- α , IL-4, IL-5의 면역조직화학 점수에서 대조군과 비교하여 BKC군의 유의한 증가가 확인되었다(그림 16).



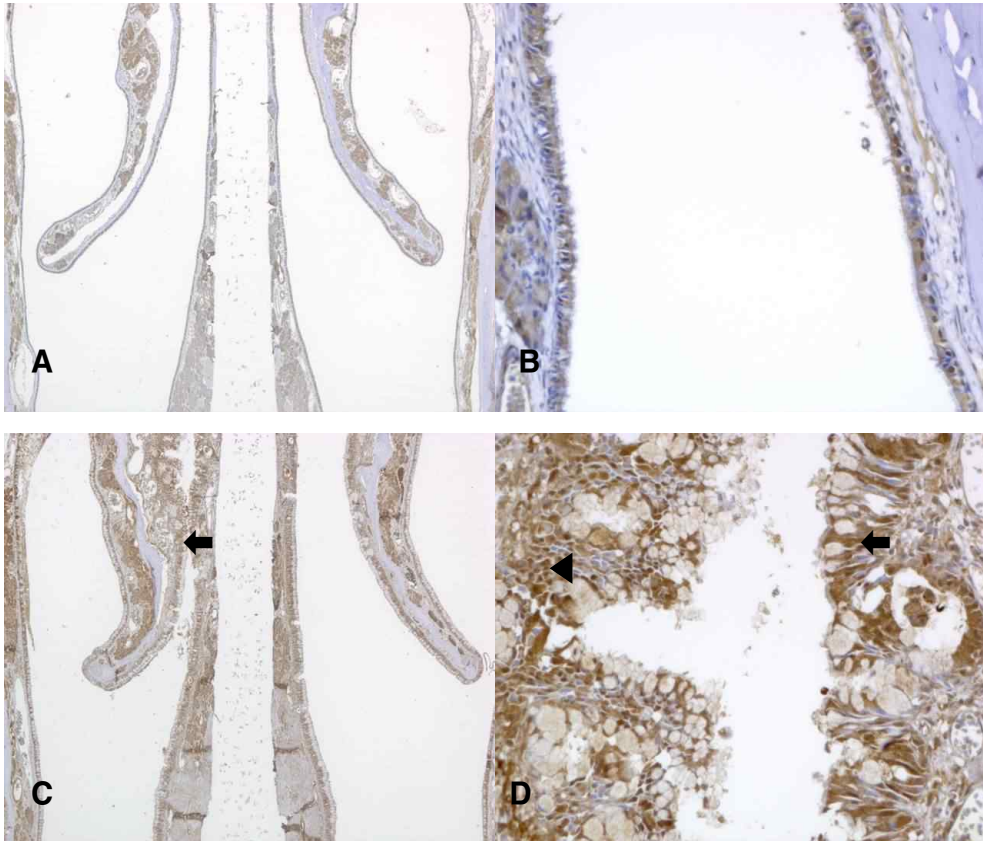
[그림 16] 비강의 알레르기 반응 관련 표지자 면역조직화학 점수 비교 결과

대조군과 유의성 있게 차이 있음 : ** $p < 0.01$

7. 산화스트레스 표지자 면역조직화학 결과

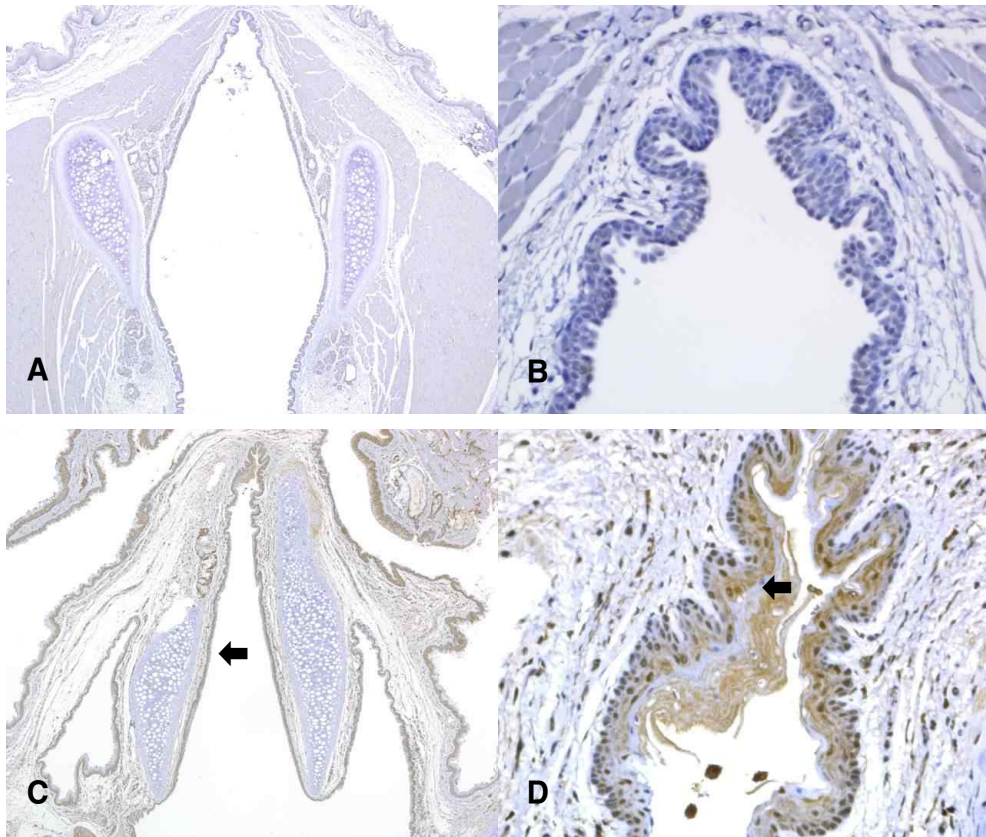
1) 8-OHdG

비강에서 8-OHdG는 대조군에서는 호흡상피 및 점막하샘 등에서 미미하게 발현되었다. 반면, BKC군에서는 점액세포 비대 및 과다형성을 포함한 상피세포 및 고유관의 호산구 등 염증세포에서 강한 양성 반응이 관찰되었다(그림 17). 후두에서 대조군에서는 상피에서 거의 발현되지 않았다. 반면, BKC군에서는 편평상피 화생 등 상피에서 강한 양성 반응이 관찰되었다(그림 18). 기관에서 대조군에서는 상피에서 거의 발현되지 않았다. 반면, BKC군에서는 상피 증식 등 상피에서 강한 양성 반응이 관찰되었다(그림 19). 폐에서는 대조군에서 거의 발현되지 않았다. 반면, BKC군에서는 세기관지 상피, 제2형 폐포세포 및 일부 폐포 대식세포에서 강한 양성 반응이 관찰되었다(그림 20).



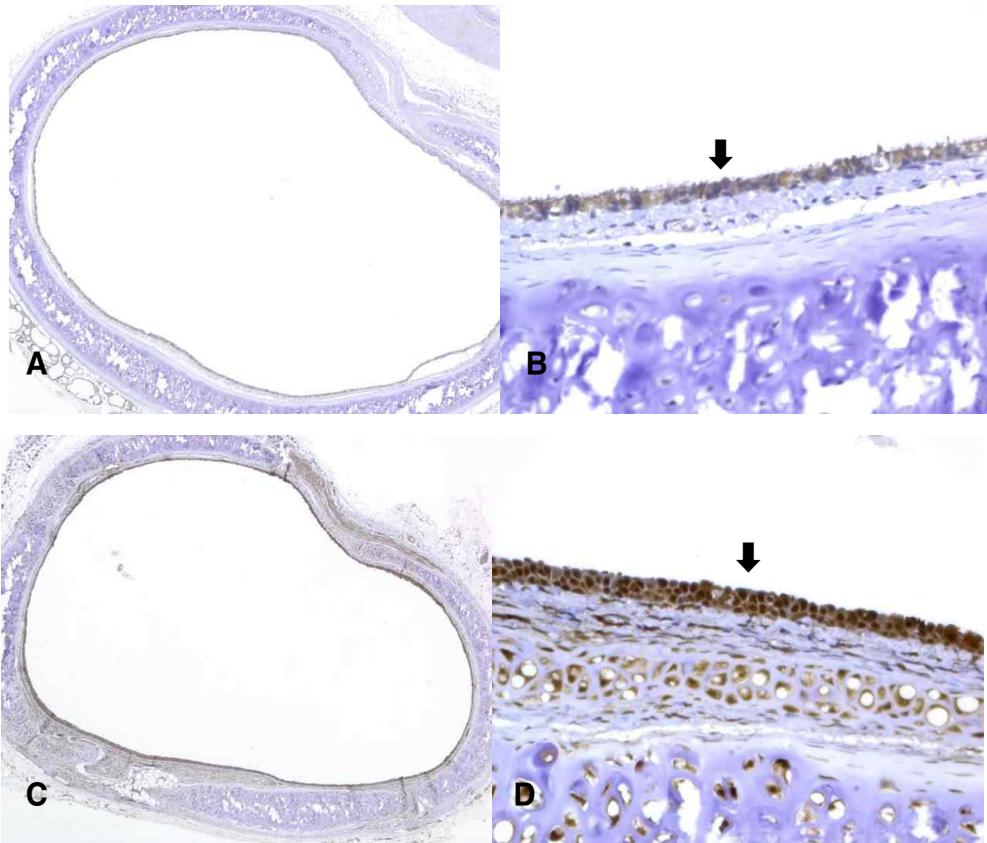
[그림 17] 비강의 8-OHdG 면역조직화학 결과

A), B) 비강에서 특이적인 반응은 관찰되지 않았다. 대조군, C), D) 비강에서 점액세포 비대 및 과다형성(화살표), 고유판의 호산구 등 염증세포(화살표머리)에서 양성반응이 관찰되었다. BKC군, 각 50배, 400배, IHC.



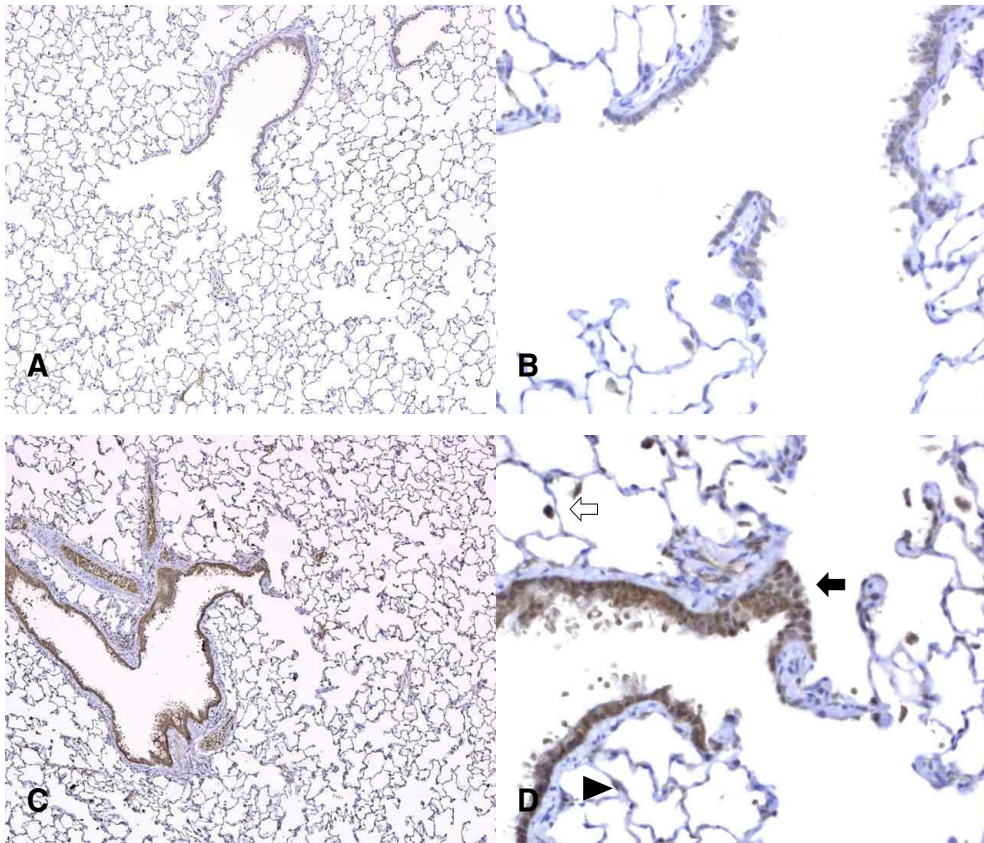
[그림 18] 후두의 8-OHdG 면역조직화학 결과

A), B) 후두에서 특이적인 반응은 관찰되지 않았다. 대조군, C), D) 후두의 편평상피 화생(화살표)에서 양성반응이 관찰되었다. BKC군, 각 50배, 400배, IHC.



[그림 19] 기관의 8-OHdG 면역조직화학 결과

A), B) 기관에서 특이적인 반응은 관찰되지 않았다. 대조군, C), D) 기관의 상피 증식(화살표)에서 강한 양성 반응이 관찰되었다. BKC군, 각 50배, 400배, IHC.

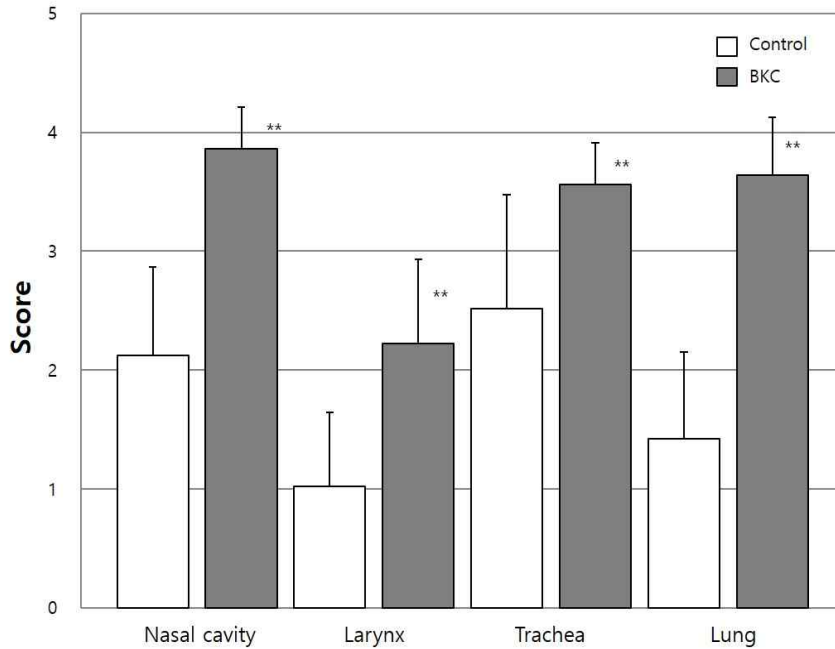


[그림 20] 폐의 8-OHdG 면역조직화학 결과

A), B) 폐에서 특이적인 반응은 관찰되지 않았다. 대조군, C), D) 세기관지 상피(화살표), 제2형 폐포세포(화살표머리) 및 폐포대식세포(흰화살표)에서 강한 양성 반응이 관찰되었다. BKC군, 각 100배, 400배, IHC.

2) 호흡기계 조직의 산화스트레스 점수 비교

8-OHdG 면역조직화학 점수 비교 시, 비강, 후두, 기관, 폐에서 모두 대조군과 비교하여 BKC군의 유의한 증가가 확인되었다(그림 21).



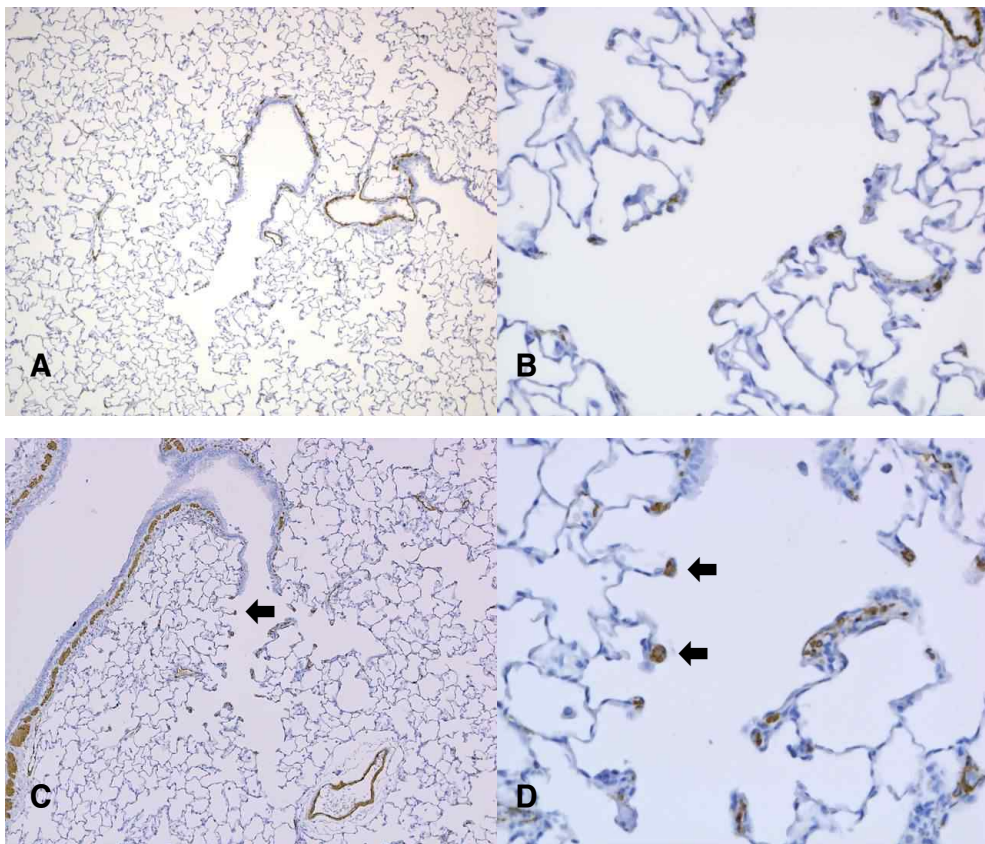
[그림 21] 호흡기계조직의 8-OHdG 면역조직화학 점수 비교 결과

대조군과 유의성 있게 차이 있음 : ** $p < 0.01$

8. 세기관지 폐포 연접부 평활근 관련 면역조직화학 결과

1) α -SMA

α -SMA는 대조군에서 정상조직에 외에 특이반응은 없었으나, BKC군에서는 세기관지 폐포 연접부에서 강한 양성 반응이 관찰되었다(그림 22).

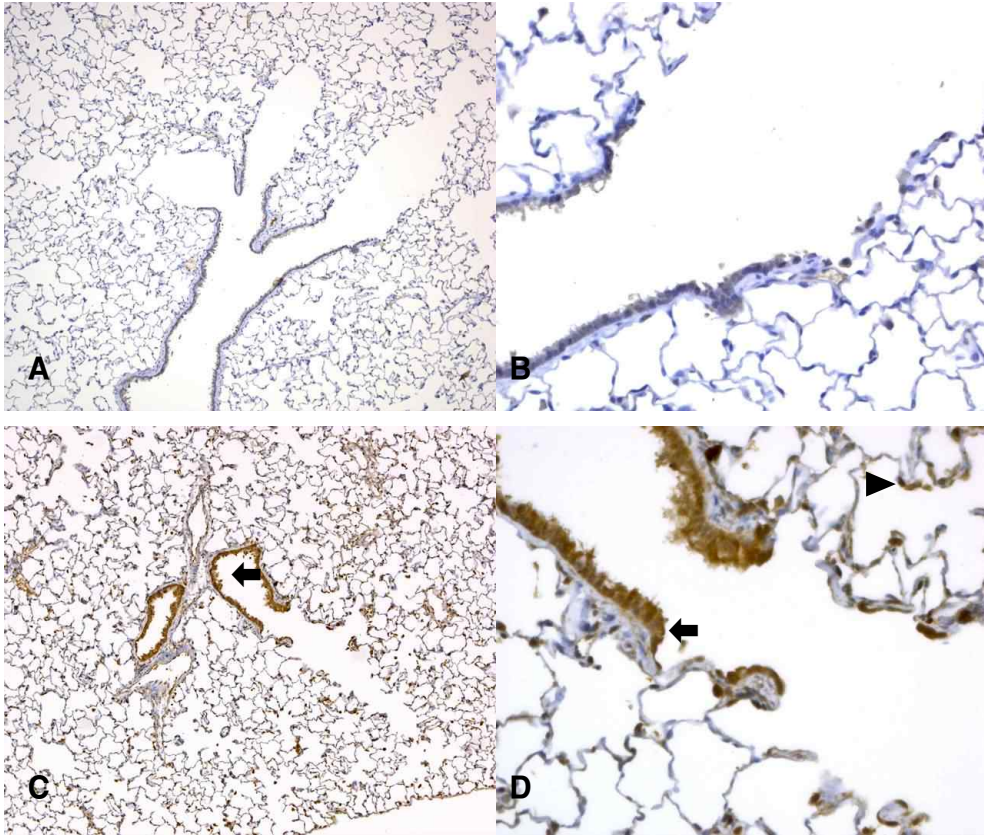


[그림 22] α -SMA 면역조직화학 결과

A), B) 폐에서 특이적인 반응은 관찰되지 않았다. 대조군, C), D) 폐의 세기관지 폐포연접부(화살표)에서 양성반응이 관찰되었다. BKC군, 각 100배, 400배, IHC.

2) TGF- β

TGF- β 는 대조군에서 세기관지 상피에서 미미하거나 거의 발현되지 않았다. BKC군에서는 세기관지 상피 및 폐포의 제2형 폐포세포에서 강한 양성 반응이 관찰되었다(그림 23).

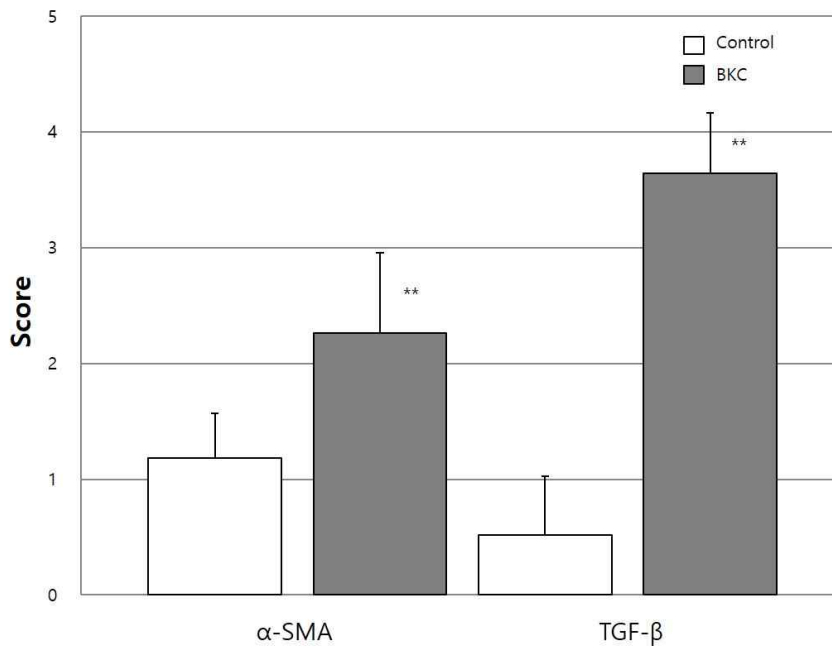


[그림 23] TGF- β 면역조직화학 결과

A), B) 폐에서 특이적인 반응은 관찰되지 않았다. 대조군, C), D) 세기관지 상피(화살표) 및 제2형 폐포세포(화살표머리)에서 강한 양성 반응이 관찰되었다. BKC군, 각 100배, 400배, IHC.

3) 평활근 비대 관련 표지자 점수 비교

α -SMA 및 TGF- β 면역조직화학 점수에서 α -SMA 및 TGF- β 모두 대조군과 비교하여 BKC군의 유의한 증가가 확인되었다(그림 24).

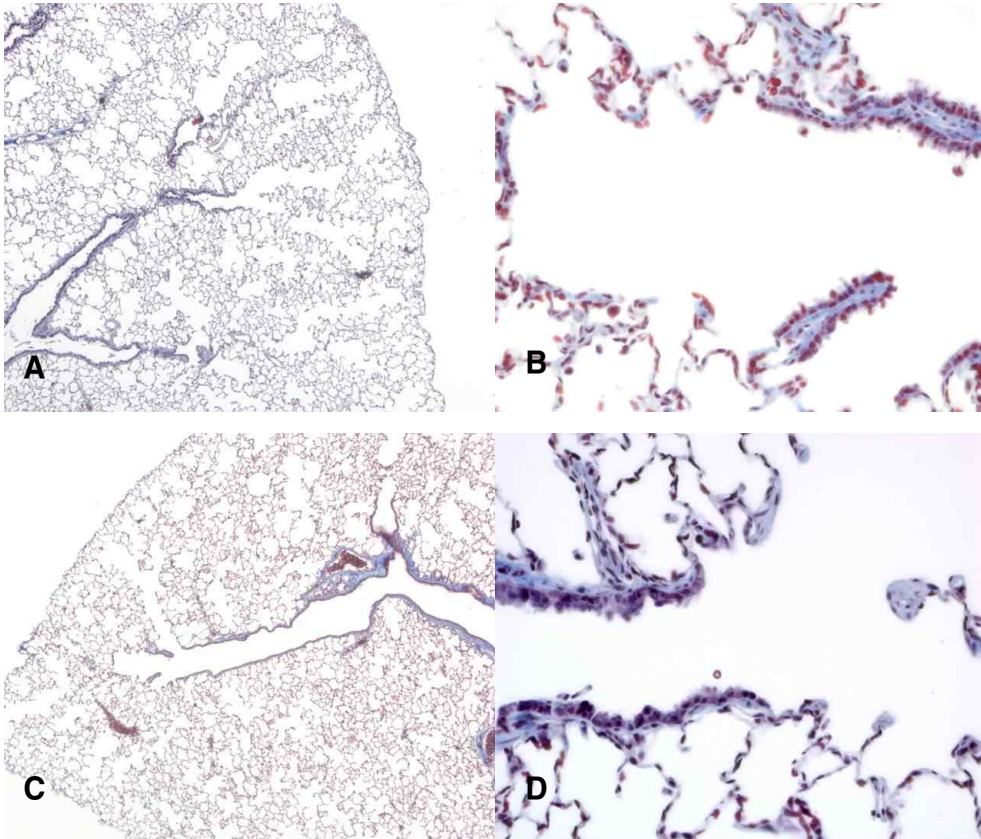


[그림 24] 평활근 비대 관련 표지자 면역조직화학 점수 비교 결과

대조군과 유의성 있게 차이 있음 : ** $p < 0.01$,

4) MT 염색 결과

폐에서 대조군 및 BKC군 모두 세기관지, 기관지, 혈관 주위에서 진한 청색으로 염색되었으나 세기관지 폐포 연결부에서는 염색이 확인되지 않았다(그림 25).



[그림 25] 폐의 MT염색 결과

A), B) 폐의 세기관지 폐포 연결부에서는 염색이 확인되지 않았다. 대조군, C), D) 폐의 세기관지 폐포 연결부에서는 염색이 확인되지 않았다. BKC군, 각 50배, 400배, MT.

IV. 고 찰

살생제란 유해한 생물체를 제어 및 제거하기 위한 화학물질로, 2011년에는 가습기 살균제가 임산부 또는 영유아의 원인불명의 폐질환을 유발하여 사망하는 사건이 발생하여, 살생제가 사회적으로 큰 문제가 되었으나, 아직까지 살생제에 관한 독성 연구가 부족한 실정이다. BKC는 4 급 암모늄 구조를 가진 양이온성 계면활성제로서 산업, 생활, 의료환경에서 살균제 또는 보존제로 사용되어 왔으나, 그동안 흡입독성에 대한 연구는 많이 이루어지지 않았다.

그동안 수행된 연구에서 알레르기 접촉성 피부염 등 BKC가 알레르기 유발하는 것으로 알려져 있으며(Orsini et al., 2018), 사람결막세포에서 BKC가 산화적 스트레스를 유발하는 것으로 알려져 있다(Debbasch et al., 2001). 폐에서는 시험물질 자극에 의해 세기관지 폐포 연접부에서 평활근 비대 등 시험물질 자극에 의한 소견이 발생하였다(서동석, 2019). 따라서 본 연구는 BKC의 13주 아만성 흡입독성 시험의 호흡기계에서 알레르기 비염, 산화스트레스, 세기관지 말단 비대가 유발되는 독성기전을 확인하였다.

본시험에서, 조직병리검사 결과, BKC군에서 비강에서 호흡상피의 점액세포 비대 및 과다형성, 이행상피의 점액세포 화생, 호흡상피의 호산성 소구 및 후각상피의 호산성 소구/결정이 관찰되었다. 또한, 호흡상피의 과다형성, 고유판의 호산구 침윤, 후각상피의 위축이 관찰되었다. 후두에서 상피의 편평상피 화생, 상피의 과다형성, 호흡상피의 점액세포 비대 및 과다형성 상피 위축 및 고유판의 호산구 침윤이 관찰되었다. 또한, 기관에서는 상피의 과다형성, 상피의 점액세포 비대 및 과다형성 및 상피 위축이 관찰되었다. 폐에서는 세기관지 폐포 연접부의 평활근 비대, 종말 세기관지 상피의 위축, 변성 및 재생, 기관지 및 세기관지의 점액세포 비대 및 과다형성, 혈관주위의 호산구 침윤 및 세기관지 폐포 연접부의 염증세포 침윤이 관찰되었다. 또한, 세기관지 상피의

호산성 소구가 관찰되었다.

이러한 변화는 중 이런 소견은 시험물질에 의한 자극 및 손상 또는 아차적 적응성 변화로 판단된다. 특히, 비강의 호흡상피 고유판의 호산구 침윤 비강 내 호흡상피 점액세포 비대 및 과다형성은 사람에서 알레르기 비염 증상과 유사한 소견을 보이고 있다. 이런 변화는 호산구 침윤은 Astra Blue-Vital New Red 염색으로 다른 염증세포와 감별하였으며, 점액분비는 Alcian blue-PAS 염색으로 특이적으로 확인하였다. 혈액학적 검사에서 대조군과 비교하여 BKC군에서 호산구 수와 비율의 증가도 이를 뒷받침한다.

알레르기 비염은 점막 표면의 수지상 세포 등 항원 제시세포가 알레르기항원을 가공하여 일부 펩티드를 major histocompatibility complex(MHC) II 분자에 발현하여 MHC II-항원 복합체를 이루고 naive CD4⁺ T 세포의 T세포 수용체와 결합하고 알레르기 항원에 특이적인 Th2 세포로 분화시킨다. 그 다음 활성화된 Th2 세포는 IL-4, IL-5 등 여러 사이토카인을 분비하여 B 세포가 IgE를 생산하게 하여 비만세포, 호산구, 호염구 등 증식을 유도하고, 특히 IgE는 비만세포 또는 호염구의 표면의 고친화성 IgE 수용체에 결합한다(Broide, 2007;Chaplin, 2006). 비염 환자에서 알레르기항원이 노출되면 30분 이내에 비루, 재채기 등 증상이 보였다가 회복되고 약 6시간 후에 코막힘이 다시 나타났다 서서히 회복되는 증상이 나타난다. 이렇게 알레르기 항원에 노출된 후 나타나는 증상의 두가지 양상을 조기반응과 후기반응으로 나눌 수 있다. 조기반응은 항원의 재감작에 따른 비만세포의 반응으로 1형 과민반응에 해당된다. 자극을 받은 비만세포는 프로스타글란딘, 히스타민, 류코트리엔 등의 화학매개물질을 분비하여 재채기 등의 증상을 유발하며(Prussin and Metcalfe, 2006). 반면, 후기반응은 주로 전기 반응에 의해 동원된 호산구에 의해 이루어진다. 호산구 등 염증세포는 비강 점막에 모여들어 정상조직을 손상시키고 재형성시키는 과정을 유발하고, 알레르기비염 환자들이 만성 코막힘의 주요 기전이 된다(Kay, 2001).

알레르기 염증과 관련하여 MUC5AC와 TNF- α 는 점액분비 활성지표이다

(Groneberg et al., 2002;Lora et al., 2005). 또한, 알레르기 연관된 대표 사이토카인과 항체로는 IL-4, IL-5, IgE가 있는데, Th2 세포가 IL-4를 분비하여 B세포를 유도하며, B세포는 IgE를 분비하여는 비만세포 또는 호염기구를 유도한다. 그리고 이들 세포는 IL-5를 분비하여 호산구를 유도하는 것으로 알려져 있다(Min, 2013). 분시험에서는 면역조직화학과 BALF ELISA로 알레르기 표지자를 평가하였다. 면역조직화학 결과, 비강에서 MUC5AC, TNF- α , IL-4, IL-5는 BKC군에서는 호흡상피의 점액세포 비대 및 과다형성 부위의 점액세포 및 호흡상피 과다 증식 또는 고유판의 호산구 등 염증세포에서 강한 양성 반응이 관찰되었다. 또한, 면역조직화학 점수 비교 시 대조군과 비교하여 BKC 군의 유의한 증가가 확인되었다. BALF ELISA결과에서도 IL-4, IL-5, TNF- α , IgE 모두 대조군과 비교하여 BKC군의 유의한 증가가 확인되었다. 다른 연구에서도 본 결과를 뒷받침하는 결과들이 확인되었다. 상피조직에서 MUC5AC는 폐질환에서 점액세포 증식 부위에서 발현 증가하는 것으로 알려져 있으며(Groneberg et al., 2002), TNF- α 는 점액세포에 신호를 전달하여 점액분비를 증가시키는 것으로 알려져 있다(Ishinaga et al 2001;Lora et al., 2005). 만성알레르기 염증에서는 점막과 호산구에서 TNF- α 가 분비되며(Galli et al., 2008), 흡연자의 기관지에서 점막 자극으로 인한 점막의 증식 및 화생에서도 TNF- α 발현이 되는 것이 보고되었다(Naidu et al., 2004). IL-4 및 IL-5는 사람의 상피세포와 호산구에서 발현이 확인되었다(Broide et al., 1992;Humbert et al., 1996;Nonaka et al. 2001;Salvi et al. 1999). 호산구는 IL-4를 분비하여 알레르기 염증을 조절하는 것으로 알려져 있으며, IL-5는 자가 분비 (autocrine)를 하여 염증 활성을 유지하는 것으로 알려져 있다(Bjerke et al., 1996; Broide et al., 1992).

IgE는 알레르기 반응에서 관여하는 주요 면역글로불린으로서 잘 알려져 있다. IgE를 생산하는 B세포 인 형질세포는 신체에서 소화기 및 호흡기에 존재하는 점막 및 림프 조직에 존재하는데 사람에서 특히 편도 및 아데노이드에 가장 많이 분포해 있다. 생산된 IgE는 점막 조직과 분비물 내에 존재하거나 또는 비만 세포

와 결합된 상태로 존재하여 전신 혈류에서 비만 세포 또는 호염기구 세포들에게 전달된다. 일반적으로 알레르기 질환을 진단하기 위해서 혈청 내 총 IgE를 측정하거나 직접적인 원인을 확인하기 위해서는 특이 IgE를 측정한다(정혜리, 2007). 본 시험에서는 총 IgE로 알레르기 항원 반응을 검사하였다. 총 IgE는 아토피 피부염, 알레르기 비염, 기관지 천식 등 알레르기 환자에서 높게 증가하나, 환경, 음식, 기타 감염원 등 요인에 의해서 증가 하는 경우도 있어 알레르기 영향을 특이적으로 감별하기 어려운 한계점이 있다(Koh et al., 2013). 그러나 특이 IgE는 혈청에서 RAST(Radio allergy sorbent test), MAST(Multiple allergen simultaneous test), ImmunoCAP system 검사로 확인이 가능하나, 땅콩 등 식품, 개 및 고양이 등 동물, 집먼지 등 환경 등 사람에게 노출 가능성이 많고 이미 알레르기를 유발하는 것으로 알려진 물질만 진단법이 확립되어 있어, 대부분 이런 물질에서만 특이 IgE로 측정하는 것이 가능하다(남영희 등, 2013). 따라서, BKC는 특이 IgE로 진단법이 확립되지 않은 물질이 때문에 특이 IgE 측정은 어려우나 총 IgE로 IgE 측정이 가능하다고 판단된다. 기존 연구에서도 BKC는 이런 한계점 때문에 총 IgE로 BALF와 혈청에서 측정을 하였다(Swiercz et al., 2013). 하지만, 본 시험 같은 GLP(Good laboratory practice) 동물시험의 경우는 시험 환경이 통제되므로 사료나 환경적인 요인에서 오는 알레르기 반응이 발생하는 조건은 동일하다고 했을 때, 대조군과 비교하여 BKC군의 총 IgE 증가는 BKC 특이 IgE 증가가 원인으로 판단된다. 따라서, 위 결과들과 관련 연구들로부터 BKC가 랫드의 비강에서 알레르기 반응을 유발하여 비염을 유발하는 것을 시사한다. 국립환경과학원 조사에서 병원을 내원한 가슴기 살균제 사용자의 474명을 대상으로 조사한 결과 전체 응답자의 55.6%가 호흡기질환으로 진단을 받았으며, 그 중 비염이 32.5%가 확인된 사실도 이를 뒷받침한다(국립환경과학원, 2017). 많은 연구에서 BALF와 혈청에서 이런 알레르기 표지자의 증가 경향이 유사한 결과로 보고되었지만(Chiang et al., 2019; Chu et al., 2017), 혈액에서 알레르기 관련 표지자를 BALF로 간접적으로 확인하는 것은 본 연구 결과의 제한점으로 사료된다.

산화 스트레스는 활성산소종(Reactive oxygen species, ROS) 및 활성질소종(Reactive nitrogen species, RNS) 등 산화제 발생에 비하여 이를 억제하는 superoxide dismutase(SOD) 및 glutathione(GSH), 같은 항산화 물질이 상대적으로 충분하지 않는 상태에서 발생한다(조유숙, 2008). 활성산소종은 산소기(Oxygen radical)와 산소 비자유기 유도체를 포함하며, Superoxide(O_2^-), Hydrogen peroxide(H_2O_2)와 Lipid peroxy radical (LOO^-) 등은 세포구성 성분과 매우 반응성이 높아, 직접적인 조직손상 또는 세포신호 전달 체계를 매개로 간접적인 조직 손상을 유발한다(임동건, 2004).

8-OHdG(8-Hydroxydeoxyguanosine)는 DNA 염기와 활성산소종인 Hydroxyl radical($HO\cdot$)이 반응하여 발생하는 DNA 산화스트레스 부산물로, 구아닌 같은 핵산 염기서열과 Hydroxyl radical이 상호 작용하여 전자를 빼앗아 8-OHdG가 형성된다(Kasai, 1997; Valko et al., 2004). 8-OHdG는 염증성 장질환, 2형 당뇨병, 뇌졸중, 동맥경화증, 비알코올성 지방간염 등 질병에서 확인되었다(Chen YC; 2011; David et al, 2012; Ding X et al. 2005; Hsieh et al, 2014; Nakamura et al, 2010).

8-OHdG는 액체 가스크로마토그래피-질량 분석법/질량 분석법(Liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry), 고성능 액체크로마토그래피(Ultra-high performance liquid chromatography), 면역세포화학(Immunocytochemistry), 간접 면역형광검사(Indirect immunofluorescence), 면역조직화학(Immunohistochemistry)로 조직, 혈청, 뇨에서 검출이 가능하다(Korkmaz et al, 2018). 특히, 면역조직화학에서 8-OHdG가 폐조직에서 단백질 산화스트레스 산물인 Nitrotyrosine보다 산화스트레스를 민감하게 확인하는 것으로 보였다(이용훈, 2018).

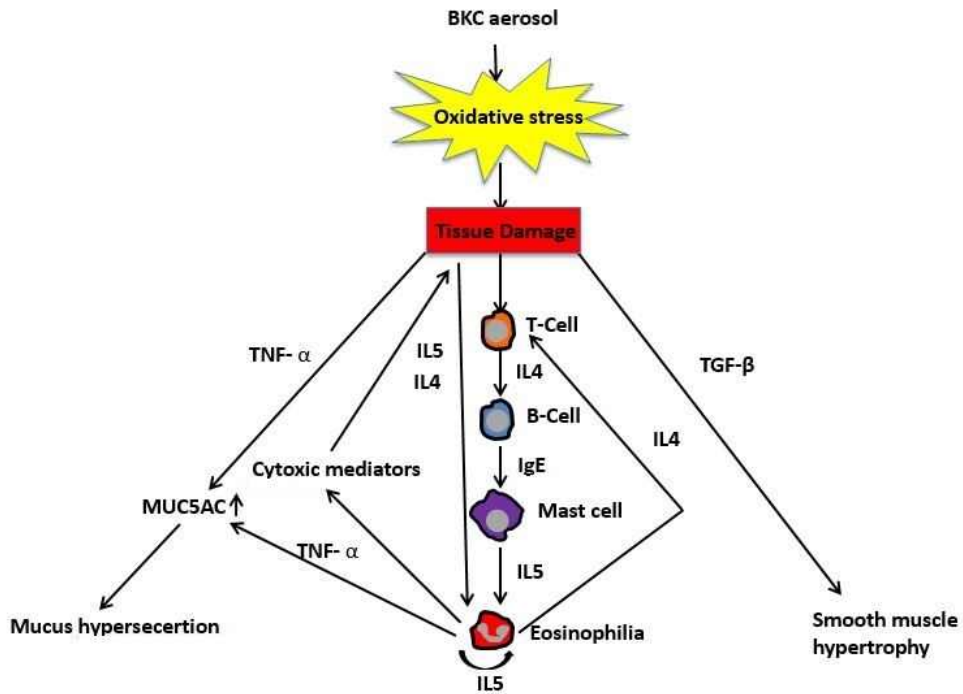
본 시험에서는 8-OHdG는 BKC군에서 비강의 점액세포 비대 및 과다형성을 포함한 호흡상피 및 점막하 조직의 호산구 등 염증세포, 후두의 편평상피 화생 등 상피에서 강한 양성 반응이 관찰되었다. 또한, 기관의 상피 증식 등 상피에

서 강한 양성 반응이 관찰되었다. 폐에서는 세기관지 상피 및 제2형 폐포세포에서 강한 양성 반응이 관찰되었다. 공기 오염에 노출된 어린이의 비강상피에서 8-OHdG 증가가 확인되었으며(Calderon-Carciduenas et al., 1990), 면역조직화학에서 랫드에서 화상을 유발한 기관 상피에서 확인되었으며(Jacob et al, 2017), 실리카 주입된 마우스 폐에 기관, 세기관지 및 폐포 상피세포, 폐포 대식세포에서 확인되었다(Kaewamatawong et al., 2006). 또한, 담낭염의 염증세포에서도 확인되었다(Seki et al, 2002). 8-OHdG 면역조직화학 점수 비교 시 비강, 후두, 기관, 폐에서 모두 대조군과 비교하여 BKC 군에서 유의하게 증가하였으므로, 시험동물의 호흡기계 장기에서 BKC가 산화스트레스를 유발하는 것을 확인할 수 있었다. 이런 산화스트레스와 알레르기 반응의 연관성을 시사하는 연구가 다수 보고되었다. 천식환자에서는 호기에서 H_2O_2 가 정상인보다 높게 검출되고, H_2O_2 농도가 높을수록 천식 정도가 심하였다(Emelyanov et al., 2001; Jarjour and Calhoun, 1994). 천식환자에서 수집한 대식세포에서 더 많은 O_2^- 가 생산되어지고(Calhoun et al., 1992), 항원에 자극된 호산구에서 활성산소종이 증가하였다(Sanders et al., 1995). 또한, 알레르기비염 환자에서 오존이 비염을 악화시킨다고 알려져 있으며(Riediker et al., 2001), 알레르기비염 환자의 비강에서 수집한 호산구에 항원을 처리하면 활성산소의 발생이 증가한다고 보고되었다(Ogasawara et al., 1991).

또한, 폐에서 세기관지 폐포 연결부위 평활근 비대 기전을 확인하기 위하여 α -SMA와 TGF- β 면역조직화학을 실시하였고, 섬유증과 감별진단을 위하여 MT 염색을 실시하였다. 시험결과, 세기관지 폐포 연결부위에서 소견 부위가 α -SMA 면역조직화학에서는 양성, MT염색은 음성으로 확인되어 소견부위는 콜라겐이 아닌 평활근으로 확인하였다. α -SMA는 평활근 특이 항원으로 대조군에서 기관지, 세관지, 혈관 주위에서 확인되었으나 정상적으로 확인될 수 있는 조직이며, 대조군과 달리 BKC군에서 세기관지 폐포 연결부에서 강한 양성 반응이 관찰되었다. TGF- β 도 BKC군에서 세기관지 상피 및 제2형 폐포세포에서 강한 양성 반

응이 관찰되었는데, α -SMA 및 TGF- β 모두 대조군과 비교하여 면역조직화학 점수가 증가하였다. TGF- β 는 *in vivo*에서 기도의 평활근 비대를 유도하는 것으로 보고되었으며(Goldsmith et al., 2006), 랫드에서 Silica 투여 시 대식세포와 섬유아세포, 제2형 폐포세포 증식과 선암종에서 TGF- β 발현을 하였다(Williams et al., 1993). 또한, 랫드 폐고혈압 모델에서 산화스트레스가 TGF- β 를 유도하는 것으로 보고되는데(Ahmed et al., 2014), 본시험에서 면역조직화학에서 8-OHdG 발현이 TGF- β 발현 부위와 유사한 부위에서 확인되었으므로 산화스트레스가 TGF- β 를 유도하여 평활근 비대를 유발한 것으로 사료된다.

따라서, 본 연구를 종합하였을 때 BKC는 호흡기계에게 산화스트레스를 유발하며, 특히 비강에서 산화 스트레스를 유발하여 조직을 손상시키고, IL-4, IL-5, TNF- α 사이토카인을 분비하여 호산구가 침윤하고 점액을 과다 분비하는 알레르기 반응을 유발하며, 폐에서도 산화스트레스가 TGF- β 사이토카인을 유도하여 평활근 비대를 유발하는 것을 시사한다(그림 26). 본 연구는 사람에서 알레르기 비염 유발 기전을 실험동물에서 증명하였다. 하지만, 본 연구의 결과는 주로 파라핀 고정 조직에서 단백질 수준의 표지자를 특정한 것이므로 본 시험에 수행한 시험만으로 호흡기계 독성기전을 구체적으로 명시화하기에는 한계점이 존재한다. 그러므로 PCR 등 기법을 이용하여 분자 수준에서 기전 관련 표지자를 특정하는 연구가 추가로 뒷받침되어야 한다고 사료된다.



[그림 26] BKC 호흡기계 독성 기전 모식도

V. 결 론

본 연구에서는 살생제인 BKC 90일 아만성 시험의 시료에서 병리진단기법을 이용하여 알레르기 비염, 산화스트레스, 세기관지 폐포 연접부 평활근 비대가 유발되는 호흡기계 독성기전을 확인하였다.

1. 조직병리검사 결과, BKC군에서는 비강의 호흡상피의 점액세포 비대 및 과다형성, 이행상피의 점액세포 화생, 호흡상피의 호산성 소구 및 후각상피의 호산성 소구/결정이 관찰되었다. 또한, 호흡상피의 과다형성, 고유관의 호산구 침윤, 후각상피의 위축이 관찰되었다. 후두에서 상피의 편평상피 화생, 상피의 과다형성, 호흡상피의 점액세포 비대 및 과다형성 상피 위축 및 고유관의 호산구 침윤이 관찰되었다. 또한, 기관에서는 상피의 과다형성, 상피의 점액세포 비대 및 과다형성 및 상피 위축이 관찰되었다. 폐에서는 세기관지 폐포 연접부의 평활근 비대, 종말 세기관지 상피의 위축, 변성 및 재생, 기관지 및 세기관지의 점액세포 비대 및 과다형성, 혈관주위의 호산구 침윤 및 세기관지 폐포 연접부의 염증세포 침윤이 관찰되었다. 또한, 세기관지 상피의 호산성 소구가 관찰되었다. 또한 혈액학적 검사에서는 대조군과 비교하여 BKC군에서 호산구 수와 비율의 증가가 확인되었다.
2. 알레르기 반응 관련하여 면역조직화학 결과, 비강에서 MUC5AC, TNF- α , IL-4, IL-5은 BKC군에서는 호흡상피의 점액세포 비대 및 과다형성 부위의 점액세포, 호흡상피 과다증식 또는 고유관의 염증세포에서 강한 양성 반응이 관찰되었다. 면역조직화학 점수 비교 시 대조군과 비교하여 BKC 군의 유의한 증가가 확인되었다. 또한, BALF ELISA결과에서도 IL-4, IL-5, TNF- α , IgE 모두 대조군과 비교하여 BKC군의 유의한 증가가 확인되었다.

3. 산화스트레스 표지자인 8-OHdG 면역조직화학 결과, BKC군에서는 비강에서 점액세포 비대 및 증식 등 상피 및 점막하 조직의 호산구 등 염증세포에서 강한 양성 반응이 관찰되었다. 후두에서 편평상피 화생 등 상피에서 강한 양성 반응이 관찰되었다. 기관에서도 상피 증식 등 상피에서 강한 양성 반응이 관찰되었다. 폐에서는 세기관지 상피 및 폐포의 제2형 폐포세포에서 강한 양성 반응이 관찰되었다. 또한, 8-OHdG 면역조직화학 점수 비교 시 비강, 후두, 기관, 폐에서 모두 대조군과 비교하여 BKC군에서 유의하게 증가하였다.
4. 세기관지 폐포 연결부 평활근 비대 기전을 확인하기 위하여 α -SMA와 TGF- β 면역조직화학을 실시한 결과, α -SMA는 평활근 특이 항원으로 BKC군에서는 세기관지 폐포 연결부에서 강한 양성 반응이 관찰되었다. TGF- β 는 BKC군에서 세기관지 상피 및 제2형 폐포세포에서 강한 양성 반응이 관찰되었는데, 모두 대조군과 비교하여 면역조직화학 점수가 증가하였다.

이상의 결과는 BKC가 호흡기계에게 산화스트레스를 유발하며, 특히 비강에서 산화스트레스를 유발하여 조직을 손상시키고, IL-4, IL-5, TNF- α 사이토카인을 분비하여 호산구 침윤 및 점액 과다 분비 등 알레르기 반응을 유발하며, 폐에서도 산화스트레스가 TGF- β 사이토카인을 유도하여 평활근 비대를 유도하는 것을 시사한다. 특히, 이상의 결과에서 BKC가 사람에서 알레르기 비염을 유발하는 것을 증명하였으며, 이런 결과는 BKC를 사용하는 근로자와 소비자에게 유용한 건강정보와 유해성 정보를 제공할 것으로 사료된다.

VI. 참고문헌

가습기 살균제 건강피해 범위 확대를 위한 질환 선정 및 판정기준 마련, 2017. 국립환경과학원.(57-168쪽.)

남영희, 전동걸, 이수걸. 흡입 알레르겐에 대한 피부단자 시험과 혈청 특이 IgE(ImmunoCAP system)의 비교. 2015;Allergy Asthma Respir Dis 3(1):47-53.

서동석. F344 랫드를 이용한 Benzalkonium chloride의 90일 반복 흡입시험. 2019. 산업안전보건연구원;2018.(15-60쪽.)

이용훈. 병리진단기법을 이용한 유해화학물질의 호흡기계영향 연구. 산업안전보건연구원;2018.(15-60쪽.)

임동건. 산화스트레스; 활성산소종과 산화질소. 대한중환자의학회지 2004; 19(2):81-85

정해리. 혈청 IgE의 임상적 의의. Korean J Pediatr 2007;50(5):416-420

조유숙. 기관지 천식과 산화스트레스. 천식 및 알레르기 2008;28(3):167-174

Ahmed LA, Obaid AA, Zaki HF, Agha AM. Role of oxidative stress, inflammation, nitric oxide and transforming growth factor-beta in the protective effect of diosgenin in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. Eur J Pharmacol 2014;740:379-387

Bjerke T, Gaustadnes M, Nielsen S, Nielsen LP, Schiøtz PO, Rudiger N, Reimert CM, Dahl R, Christensen I, Poulsen LK. Human blood eosinophils produce and secrete interleukin 4. *Respir Med* 1996; 90(5):271-277

Broide DH. The pathophysiology of allergic rhinoconjunctivitis. *Allergy Asthma Proc* 2007;28(4):398-403

Broide DH, Paine MM, Firestein GS. Eosinophils express interleukin 5 and granulocyte macrophage-colony-stimulating factor mRNA at sites of allergic inflammation in asthmatics. *J Clin Invest* 1992;90(4):1414 - 1424

David Brea, Jaume Roquer, Joaquín Serena, Tomás Segura, José Castillo. Oxidative stress markers are associated to vascular recurrence in non-cardioembolic stroke patients non-treated with statins. *BMC Neurol* 2012;12:65. doi: 10.1186/1471-2377-12-65

Calhoun WJ, Reed HE, Moest DR, Stevens CA. Enhanced superoxide production by alveolar macrophages and air-space cells, airway inflammation, and alveolar macrophage density changes after segmental antigen bronchoprovocation in allergic subjects. *Am Rev Respir Dis* 1992;145(2 Pt 1):317-325

Calderon-Carciduenas L, Wen-Wang L, Zhang YJ, Rodriguez-Alcaraz A, Osnaya N, Villarreal-Calderon A, Santella RM. 8-hydroxy-2-deoxyguanosine, a major mutagenic oxidative DNA lesion and DNA strand breaks in nasal respiratory epithelium of children exposed to urban pollution. *Environmental*

Health Perspectives 1999;107:469–474

Chaplin DD. Overview of the human immune response. J Allergy Clin Immunol 2006;117(2 Suppl Mini-Primer):S430–435

Chiang SR, Lin CY, Chen DY, Tsai HF, Lin XC, Hsu TC, Tzang BS. The effects of human parvovirus VP1 unique region in a mouse model of allergic asthma. PLoS One 2019;14(5):e0216799. doi: 10.1371/journal.pone.0216799. eCollection

Chen YC, Chen CM, Liu JL, Chen ST, Cheng ML, Chiu DT. Oxidative markers in spontaneous intracerebral hemorrhage: leukocyte 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as an independent predictor of the 30-day outcome. J Neurosurg 2011;115:1184–1190

Choi M, Park I, Park KY, Kim KH. Effects of β -lapachone on the Production of Inflammatory Cytokines in Mice. Cancer Prev Res 2011;16(2):155–160

Chu PY, Sun HL, Ko JL, Ku MS, Lin LJ, Lee YT, Liao PF, Pan HH, Lu HL, Lue KH. Oral fungal immunomodulatory protein-Flammulina velutipes has influence on pulmonary inflammatory process and potential treatment for allergic airway disease: A mouse model. J Microbiol Immunol Infect 2017;50(3):297–306

Debbasch C, Brignole F, Pisella PJ, Warnet JM, Rat P, Baudouin C. Quaternary ammoniums and other preservatives' contribution in oxidative

stress and apoptosis on Chang conjunctival cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(3):642-652

Deutschle T, Porkert U, Reiter R, Keck T, Riechelmann H. In vitro genotoxicity and cytotoxicity of benzalkonium chloride. *Toxicol In Vitro* 2006;20(8):1472-1477.

Ding X, Hiraku Y, Ma N, Kato T, Saito K, Nagahama M, Semba R, Kuribayashi K, Kawanishi S. Inducible nitric oxide synthase-dependent DNA damage in mouse model of inflammatory bowel disease. *Cancer Sci* 2005;96:157-163

Emelyanov A, Fedoseev G, Abulimity A, Rudinski K, Fedoulov A, Karabanov A, Barnes PJ. Elevated concentrations of exhaled hydrogen peroxide in asthmatic patients. *Chest* 2001;120(4):1136-1139

Gao Y, Wang P, Wang Z, Han L, Li J, Tian C, Zhao F, Wang J, Zhao F, Zhang Q, Lyu Y. Serum 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine Level as a Potential Biomarker of Oxidative DNA Damage Induced by Ionizing Radiation in Human Peripheral Blood. *Dose Response* 2019;7;17(1):1559325818820649. doi: 10

Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM. The development of allergic inflammation. *Nature* 2008;454(7203):445-454

Goldsmith AM, Bentley JK, Zhou L, Jia Y, Bitar KN, Fingar DC, Hershenov MB. Transforming growth factor-beta induces airway smooth muscle

hypertrophy. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006;34(2):247-254

Groneberg DA, Eynott PR, Oates T, Lim S, Wu R, Carlstedt I, Nicholson AG, Chung KF. Expression of MUC5AC and MUC5B mucins in normal and cystic fibrosis lung. *Respir Med* 2002;96(2):81-86

Herfs M, Hubert P, Poirrier AL, Vandevenne P, Renoux V, Habraken Y, Cataldo D, Boniver J, Delvenne P. Proinflammatory cytokines induce bronchial hyperplasia and squamous metaplasia in smokers: implications for chronic obstructive pulmonary disease therapy. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2012;47(1):67-79

Hsieh YW, Lin KC, Korivi M, Lee TH, Wu CY, Wu KY. The reliability and predictive ability of a biomarker of oxidative DNA damage on functional outcomes after stroke rehabilitation. *Int J Mol Sci* 2014;15:6504-6516

Humbert M, Durham SR, Ying S, Kimmitt P, Barkans J, Assoufi B, Pfister R, Menz G, Robinson DS, Kay AB, Corrigan CJ. IL-4 and IL-5 mRNA and protein in bronchial biopsies from patients with atopic and nonatopic asthma: evidence against "intrinsic" asthma being a distinct immunopathologic entity. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154(5):1497-1504

Ishinaga H, Shah SA, Sakaida H, Takeuchi K. The role of transforming growth factor- α on mucin overproduction in eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Pharmacology* 2011;88(5-6):302-308

Jacob S, Herndon DN, Hawkins HK, Enkhbaatar P, Cox RA. Xanthine oxidase

contributes to sustained airway epithelial oxidative stress after scald burn. *Int J Burns Trauma* 2017;7(6):98-106

Jarjour NN, Calhoun WJ. Enhanced production of oxygen radicals in asthma. *J Lab Clin Med* 1994;123(1):131-136

Kasai H. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat. Res* 1997;387:147-163

Kay AB. Allergy and allergic diseases. Second of two parts. *N Engl J Med* 2001;344(2):109-113

Korkmaz KS, Butuner BD, Roggenbuck D. Detection of 8-OHdG as a diagnostic biomarker. *J Lab Precis Med* 2018;3:95:1-8

Koh HS, Lee KS, Han DH, Rha YH, Choi SH. Relationship between serum total IgE, specific IgE, and peripheral blood eosinophil count according to specific allergic diseases. *Allergy Asthma Respir Dis* 2013;1(2):123-128.

Kwon HS, Bae YJ, Moon KA, Lee YS, Lee T, Lee KY, Kim TB, Park CS, Moon HB, Cho YS. Hyperoxidized peroxiredoxins in peripheral blood mononuclear cells of asthma patients is associated with asthma severity. *Life Sci* 2012;90(13-14):502-508

Lora JM, Zhang DM, Liao SM, Burwell T, King AM, Barker PA, Singh L,

Keaveney M, Morgenstern J, Gutiérrez-Ramos JC, Coyle AJ, Fraser CC. Tumor necrosis factor- α triggers mucus production in airway epithelium through an IkappaB kinase beta-dependent mechanism. *J Biol Chem* 2005;280(43):36510-36517

Min YG. Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment of Allergic Rhinitis. *Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg* 2013;56:256-565

Naidu BV, Woolley SM, Farivar AS, Thomas R, Fraga CH, Goss CH, Mulligan MS. Early tumor necrosis factor- α release from the pulmonary macrophage in lung ischemia-reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004;127(5):1502-1508

Nakamura A, Osonoi T, Terauchi Y. Relationship between urinary sodium excretion and pioglitazone-induced edema. *J Diabetes Investig* 2010;1:208-211.

Nonaka MI, Nonaka R, Woolley K, Adelroth E, Miura K, Okhawara Y, Glibetic M, Nakano K, O'Byrne P, Dolovich J. Distinct immunohistochemical localization of IL-4 in human inflamed airway tissues. IL-4 is localized to eosinophils in vivo and is released by peripheral blood eosinophils. *J Immunol* 1995;155(6):3234-3244

Ogasawara H, Yoshimura S, Kumoi T. Hydrogen peroxide generation by eosinophils in allergic rhinitis. *Auris Nasus Larynx* 1991;18(2):133-143

Orsini D, D'Arino A, Pigliacelli F, Assorgi C, Latini A, Cristaudo A. Allergic

contact dermatitis to dorzolamide and benzalkonium chloride. *Postepy Dermatol Alergol* 2018;35(5):538-539

Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:S450-456

Riediker M, Monn C, Koller T, Stahel WA, Wüthrich B. Air pollutants enhance rhinoconjunctivitis symptoms in pollen-allergic individuals. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001;87(4):311-318

Salvi S, Semper A, Blomberg A, Holloway J, Jaffar Z, Papi A, Teran L, Polosa R, Kelly F, Sandström T, Holgate S, Frew A. Interleukin-5 production by human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999 ;20(5):984-991

Sanders SP, Zweier JL, Harrison SJ, Trush MA, Rembish SJ, Liu MC. Spontaneous oxygen radical production at sites of antigen challenge in allergic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151(6):1725-1733

Schmitz-Felten E. Occupational exposure to biocides(disinfectants and metal working fluids); OSH WIKI. 2017. Available from: URL: [https://oshwiki.eu/wiki/Occupational_exposure_to_biocides_\(disinfectants_and_metal_working_fluids\)](https://oshwiki.eu/wiki/Occupational_exposure_to_biocides_(disinfectants_and_metal_working_fluids))

Seki S, Kitada T, Yamada T, Sakaguchi H, Nakatani K, Onoda N, Satake K. Immunohistochemical detection of 8-hydroxydeoxyguanosine, a marker of oxidative DNA damage, in human chronic cholecystitis. *Histopathology* 2002

;40(6):531-535

Swiercz R, Hałatek T, Wasowicz W, Kur B, Grzelińska Z, Majcherek W. Pulmonary irritation after inhalation exposure to benzalkonium chloride in rats. *Int J Occup Med Environ Health* 2008;21(2):157-163

Swiercz R, Hałatek T, Stetkiewicz J, Wąsowicz W, Kur B, Grzelińska Z, Majcherek W. Toxic effect in the lungs of rats after inhalation exposure to benzalkonium chloride. *Int J Occup Med Environ Health* 2013;26(4):647-656

Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 2004;266:37-56

Wu LL, Chiou CC, Chang PY, Wu JT. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta* 2004;339(1-2):1-9

Xue Y, Hieda Y, Kimura K, Takayama K, Fujihara J, Tsujino Y. Kinetic characteristics and toxic effects of benzalkonium chloride following intravascular and oral administration in rats. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004;811(1):53-58

Zhu J, Majumdar S, Qiu Y, Ansari T, Oliva A, Kips JC, Pauwels RA, De Rose V, Jeffery PK. Interleukin-4 and interleukin-5 gene expression and inflammation in the mucus-secreting glands and subepithelial tissue of smokers with chronic bronchitis. Lack of relationship with CD8(+) cells. *Am J*

Respir Crit Care Med 2001;164(12):2220-2228

Abstract

Study on the Respiratory Toxicity of Biocide, Benzalkonium Chloride

Yong-Hoon Lee, Dong-Seok Seo, Min Ha Km

Inhalation Toxicity Research Center, Chemical Research Bureau
Occupational Safety and Health Research Institute,
Korea Occupational Safety and Health Agency
#339-30, Exporo Yuseong-Gu, Daejeon 305-380, Korea

Objectives

Biocide is a chemical to control and eliminate harmful organism. In 2011, an outbreak of pulmonary disease with unknown cause, which pregnant women and children died from, was involved in biocides. However, the toxicity of many biocides has not been elucidated so far. Benzalkonium chloride(BKC) is quaternary ammonium compounds and has been widely used as biocide, and involved in the outbreak of pulmonary disease by humidifier disinfectants. But, the toxic mechanism of BKC has not been proved enough, especially in the route of inhalation toxicity. Therefore, in this study, we aimed to characterize the toxic mechanism of respiratory system 13-week BKC repeated inhalation

toxicity study.

Methods

In this study, male F344 rats were exposed to 0 or 1.8 mg/m³ of BKC for 13 weeks via whole-body inhalation. Histopathological and hematological examination, Astra Blue-Vital New Red, Alcian blue-PAS, MT special staining, immunohistochemistry, and ELISA were conducted in the tissue sample or BALF of rats.

Results

In histopathological examination, a variety of respiratory lesions was observed in BKC group. Especially, mucosal cell hypertrophy/hyperplasia and eosinophil infiltration in nasal cavity indicated that those lesions were similar to allergic rhinitis of human. Hematological analysis showed increase of eosinophil in BKC group compared to that of control group. Also, In immunohistochemistry and BALF ELISA, the intensity of allergic markers, MUC5AC, TNF- α , IL-4, IL-5, IgE, increased in BKC group compared to that of control group. In immunohistochemistry of oxidative stress marker, 8-OHdG, the intensity of 8-OHdG increased in nasal cavity, larynx, trachea, lung of BKC group compared to that of control group. And in immunohistochemistry of α -SMA and TGF- β , smooth muscle hypertrophy markers, the intensity of α -SMA and TGF- β increased in the lung of BKC group compared to that of control group.

Conclusion

BKC induces oxidative stress, which causes tissue injuries in the respiratory

tissue of rats. It leads to induce allergic inflammation in nasal cavity and smooth muscle hypertrophy in bronchioloalveolar junction of lung via various cytokine responses. Especially, this study elucidated the mechanism of BKC inducing-allergic rhinitis in laboratory animals. Therefore, this study will provide worker and consumers using BKC with useful information about health and chemical hazard.

Key words : BKC, Allergy, Oxidative stress

〈〈연 구 진〉〉

연 구 기 관 : 안전보건공단 산업안전보건연구원

연구책임자 : 이 용 훈 (연구위원, 산업화학연구실)

연 구 원 : 서 동 석 (연구위원, 산업화학연구실)

김 민 하 (연구원, 산업화학연구실)

〈〈연 구 기 간〉〉

2019. 1. 1 ~ 2019. 11. 30

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

산업안전보건연구원장

살생제(Benzalkonium chloride)의

호흡기계 독성연구

2019-연구원-1611

발 행 일	: 2019년 11월 30일
발 행 인	: 산업안전보건연구원장 고재철
연구책임자	: 산업화학연구실 연구위원 이용훈
발 행 처	: 안전보건공단 산업안전보건연구원
주 소	: (34122) 대전광역시 유성구 엑스포로 339번길 30
전 화	: (042) 869-8532
F A X	: (042) 863-8694
Homepage	: http://oshri.kosha.or.kr
