

## RAW 264.7 세포에 대한 중국산 천연 광물성 섬유 TAFMAG의 독성효과

가톨릭대학교 성모병원 산업의학과 · 의과대학 산업의학연구소\* · 예방의학교실\*\*

장황신 · 김경아 · 김은경 · 한진구\* · 김지홍 · 김현욱\*\* · 임 영

— Abstract —

### The Toxicologic effect of TAFMAG on RAW 264.7 cell

Hwang-shin Chang, Kyoung-ah Kim, Eun-kyoung Kim, Jin-ku Han\*,  
Ji-hong Kim, Hyun-wook Kim\*\*, Young Lim

*Department of Occupational and Environmental Medicine, St. Mary's Hospital,  
The Catholic University of Korea*

*Institute of Industrial Medicine, College of Medicine, The Catholic University of Korea\**

*Department of Preventive Medicine, College of Medicine, The Catholic University of Korea\*\**

**Objectives** : This study was designed to evaluate cytotoxicity of TAFMAG, which is a trade name of natural mineral fiber mined and produced in China.

**Methods** : The cytotoxicity of TAFMAG was evaluated by measuring iron content, lipid peroxidation, erythrocyte hemolysis, and cytotoxicity in vitro. These results were compared with the data of chrysotile and wollastonite as a positive and negative control, respectively.

**Results** : There was significant increase of Fenton activity in TAFMAG and chrysotile with dose-response pattern. The iron chelating agent, desferrioxamine, significantly decreased Fenton activity of the particulates except wollastonite. TAFMAG and chrysotile fibers significantly increased malondialdehyde concentration from lipid peroxidation of the red blood cell membrane. In erythrocyte hemolysis test, TAFMAG & chrysotile had stronger effect on erythrocyte hemolysis than wollastonite with the concentration of 1,000 g/ml. Furthermore, TAFMAG was more hemolytic than chrysotile with the concentration of 5,000 g/ml. There was a significant cytotoxic effect in TAFMAG and chrysotile on RAW cell compared with wollastonite.

접 수 : 1999년 3월 26일, 채택 : 1999년 7월 21일

교신저자 : 임 영 (Tel : 02-3779-1401, E-mail : papaya@cmc.cuk.ac.kr)

이 논문은 1997년도 해산장학금 연구비에 의하여 연구되었음.

**Conclusions :** In vitro study suggested that TAFMAG may have a similar health hazard as usual asbestos.

**Key Words :** TAFMAG, Cytotoxicity, Chrysotile, Wollastonite, Fenton activity, Lipid peroxidation

## 서 론

진폐증을 일으키는 물질중 석면은 예로부터 내열성, 내화성이 강하고 마찰계수가 높아 각종 건축자재 및 자동차 제동장치 등에 널리 사용되어왔으나, 최근 1세기 동안 폐암, 악성중피종, 석면폐증 등 치명적인 질병을 유발(Rom, 1998)하며, 분진자체의 독성도 매우 높은 것으로 알려지면서 그 대체물질의 개발 및 작업공정의 변화 등의 필요성이 점차 증가되고있는 추세이다.

석면을 이용한 여러연구에 의하면 석면이 폐장내에 흡입되어 탐식세포나 기관지폐상피세포를 사멸시키며 이러한 반응은 염증 및 섬유화 변화를 잘 일으키는 분진일수록 강력하다(Begin 등, 1989). 그러므로 분진에 의한 일차적인 세포파괴능과 분진의 인체유해성과는 밀접한 관련성이 있을 것으로 생각된다. 광물성 섬유형 분진에 의한 세포독성은 여러 가지 기전으로 설명되고 있다. 분진의 너비가 좁은 섬유분진의 경우, 길이가 길면 폐장 깊숙히 들어가 탐식작용이 불가능하므로 세포독성을 나타낼 수 있고, 탐식을 당하는 경우에도 폐장내에 흡입된 분진과 탐식세포와의 반응에 의하여 발생된 반응성 산소기-특히 hydroxyl radical(이하  $\cdot\text{OH}$ 로 약함)-가 세포막의 지질과산화물을 유발하는 반응이 일어나기도 한다(Halliwell and Gutteridge, 1986). 폐장내에서  $\cdot\text{OH}$ 의 발생은 철을 비롯한 전이금속들과 관계가 깊으며,  $\cdot\text{OH}$ 이 유전자독성을 일으키는 것으로 밝혀짐에 따라(Harris 등, 1992) 철을 비롯한 마그네슘 등의 원소함량이 높은 석면분진에서 나타나는 발암성이  $\cdot\text{OH}$ 생성과 관련이 있다고 알려져 있다.

석면대체물질로 이용되고있는 광물성 섬유분진들은 대부분 규산염(silicate)으로 석면과 광물학적 성분이 유사하며 길이와 너비의 비가 3:1 이상의 섬유형태를 하고있어, 인체에 미칠 수 있는 유해성

에 대하여 강한 의문이 제기되고 있으나 이들에 의한 발암성이나 인체독성의 기전은 아직 확실하게 밝혀져 있지않은 상태이다(Rom 등, 1998). 더욱이 최근 우리나라에서는 정확한 성분분석은 물론 기본적인 독성평가도 없이 여러종류의 자연산 광물성 섬유가 석면대체물질로 수입되어 사용되고 있으며, 이들은 건재물로 단순분류되어 수입되기 때문에 정확한 수입량 및 유통경로에 대한 조사도 되어 있지 않은 실정이다. 특히 중국에서 수입되어 사용되고있는 테프맥(TAFMAG)은 석면과 유사한 성분 및 구조를 가지고 있다는 발표(한정희 등, 1998)도 있었지만 수입시 석면대체물질로 분류되어 아직까지도 제대로 독성실험이 되어있지 않은 상태로 사용되고 있다.

따라서 본연구는 물리화학적으로 석면의 한 종류라고 생각되어지는(한정희 등, 1998) 테프맥섬유의  $\cdot\text{OH}$ 생성능과 세포독성 그리고 세포막의 지질과산화에 미치는 영향을 in vitro모형에서 백석면 및 규회석과 비교하여 알아보고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 섬유성 광물성분진

#### 1) 테프맥(상품명)

중국산의 천연섬유로 알려져 있으며, 단섬유상을 보이는 물질(T-Y-20)과 장섬유상(T-4-20)을 보이는 물질이 본실험에 이용되었다. 천연섬유는 200  $\mu\text{m}$  이상의 길이를 갖는 섬유도 섞여있어서 인체에 흡입가능한 길이로 만들기 위하여 가위로 자른후, 막자사발에 갈아서 사용하였다.

#### 2) 석면

양성 대조군으로는 이미 독성이 알려진 석면의 일종인 백석면(chrysotile)을 이용하였다. 본연구에 사용되어진 백석면은 일본작업환경측정협회에서 표준화한 시료인 JAWE111을 사용하였다.

3) natural nonasbestos fibrous silicate

음성대조군으로는 자연산규산염으로 광물성 섬유이나 상대적으로 독성이 적은 규회석(wollastonite)이 이용되었다(Raymond 등, 1996). 본실험에 사용되어진 규회석은 The Japan Fibrous Material Reserch Association(JFMRA)에서 표준화한 JEM 표준분진인 W01을 이용하였다.

4) 광물성섬유 섬유수와 길이분포측정 및 분진처리 실험에 사용된 광물성섬유의 단위무게당 섬유수와 길이의 분포를 조사하였다. pore size가 0.8  $\mu\text{m}$ 인 cellulose ester membrane filter를 vacuum filter system에 연결하여 적절한 농도로 희석한 광물성섬유 현탁액 1 ml를 여과시킨 후 95 % ethanol로 세척하였다. membrane filter를 건조시킨후 slide glass 위에 acetone vapor로 고정하였다. Walton-Beckett graticule이 삽입된 위상차현미경으로 400배 배율에서 membrane을 고정한 slide를 관찰하여 g당 섬유수로 환산하였고 섬유길이의 분포도 측정하였다(Table 1). 모든 분진들은 실험하기전 내독소를 제거하기 위하여 고압멸균하였으며, 용도에 따라 phosphate buffered saline(PBS, Sigma, St. Louis, Mo)나 배지에 희석하여 2시간 동안 초음파처리한 후 사용하였다.

2. 실험관내 광물성 섬유의 Fenton activity 측정 및 철착화제 처리에 따른 변화

1) 광물성 섬유의 Desferrioxamine처리 및 분진으로부터 용출된 철농도측정

분진에 함유된 철을 제거하기 위하여 분진을 25 mM의 desferrioxamine(Sigma, St. Louis, MO) 용액에 37  $^{\circ}\text{C}$ 에서 72시간 동안 처리한 후 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상층액내

에 desferrioxamine에 의하여 분진으로부터 용출된 철의 량을 측정하기 위하여 Varian SpetrAA 250 plus를 이용하여 248.3 nm의 파장에서 철에 대한 AA분석(atomic absorption analysis)을 시행하였고, 남은 분진은 PBS로 3번 세척하였다. 마지막으로 PBS로 분진의 농도가 10 mg/ml가 되도록 희석하였다. desferrioxamine을 포함하지 않은 증류수에 같은 조건으로 분진을 처리하여 철을 용출하지 않은 대조군으로 이용하였다.

2) 광물성 섬유의 Fenton Activity

분진의 산소기 생성능력의 변화를 알아보고자 분진의 fenton catalyst로서의 작용능을 deoxyribose를 검출물질(detector material)로 하여 측정하였다(김경아 등, 1997). 유리실험관에 deoxyribose 1.0 mM, 과산화수소 1.0 mM, ascorbate 1.0 mM, 그리고 0, 10, 100, 500, 1000, 5000 g/ml의 chrysotile, T-Y-20, T-4-20, wollastonite를 넣고 37  $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 반응시킨후 1,200 g에서 10분간 원심분리하였다. 그후 상층액 1 ml를 주의깊게 채취하여 1.0 % thiobarbituric acid (TBA, Sigma, St. Louis, MO) 1 ml와 2.8 % trichloroacetic acid(TCA, Sigma, St. Louis, MO) 1 ml를 넣고 100  $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 반응시킨 후 얼음속에 넣어 냉각시켰다. 또한 철분 착화제에 의한 fenton activity 억제효과를 알아보기 위하여 25 mM의 desferrioxamine을 추가한 후 1000  $\mu\text{g}$ /ml의 분진농도에서 fenton activity를 측정하였다. microplate reader(EL 315e, Bio-Tek Instruments)로 532 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 시료는 5배수로 준비하여 반복 측정하였다.

Table 1. Number and Length distribution of Mineral Fibers

	No. of fiber/ $\mu\text{g}$	Length distribution(%)		
		5~<10 $\mu\text{m}$	10~20 $\mu\text{m}$	20 $\mu\text{m}$ ~
Chrysotile	2,237.25	9.5	48.3	41.1
Wollastonite	942.12	52.7	46.5	0.8
T-Y-20	716.47	56.8	37.8	5.4
T-4-20	609.46	52.5	46.8	0.7

### 3. 적혈구 용혈반응

사람의 적혈구를 PBS로 2회 세척한 후 PBS로 희석하여 2% 적혈구액을 만들었다. 2% 적혈구액에 각각의 광물섬유를 10, 100, 1000, 5000 µg/ml의 농도로 희석하여 가하고 37 °C에서 1시간동안 반응시킨 후 원심분리하였다(Kennedy 등, 1989). 상층액내의 혈색소(hemoglobin)양을 spectrophotometer를 이용해 540 nm 파장에서 측정하여 분진에 의한 용혈정도(AE)를 알아보았다. 분진이 포함되지않은 PBS만으로 반응시킨 것을 음성대조군(A0)으로, 0.5% Triton-X 100이 함유된 PBS로 반응시킨 것을 100% 용혈을 일으킨 양성대조군(A100)으로 하여 용혈백분율을 환산하였다.

### 4. 광물성섬유에 폭로된 적혈구막의 지질과산화도 측정

2% 적혈구 2 ml에 광물성섬유농도를 500 µg/ml로 하여 12시간 동안 37 °C CO<sub>2</sub> incubator에서 배양한 후 TBA, TCA 그리고 0.01% butylated hydroxytoluene을 넣고 20분 동안 가열하였다(Kennedy 등, 1989). 2000 g로 원심분리한 후 상층액내 malondialdehyde농도를 532 nm 파장에서의 흡광도에서 측정하였다. 모든 시료는 4회 반복실험을 하였다.

### 5. RAW세포의 세포독성측정

사람의 대식세포와 생물학적 성상이 유사한 것으로 알려져 있는 단핵구 세포주인 RAW264.7(ATCC TIB 71, Rockville, MD)를 각각의 분진에 의한 세포독성측정(김경아 등, 1997)에 이용하였다. 96 well plate에 RAW 264.7 세포를 각 well 당  $1 \times 10^4$ 개가 되도록 분주하고 24시간 동안 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양한 후 2회 세척하였다. 분진이 포함된 배지로 갈아주고 24시간 동안 다시 배양하였다. 이때 분진의 농도는 1000 g/ml로 하였다. 100% 세포독성의 지표(A100, TX100)는 배지에 0.05% triton-X가 포함되도록 하였고, 0% 세포독성의 지표(A0)는 배지만을 넣어서 배양한 군으로 하여 세포독성을 환산하였다. 반응이 끝난후 PBS로 세척하고 0.006% neutral red가 포함된 phenol red가 없는 배지로 갈아준 뒤 75분간 배양하였다. 배양이

끝난후 PBS로 다시 세척하고 30% ethanol에 0.01 N HCl이 포함되도록 한 용출액을 가한 후 532 nm에서 microplate reader로 흡광도를 측정하였다.

### 6. 통계적 처리

각각의 결과에 대해 비모수적 분산분석을 실시하였으며, 양성 및 음성대조군과 Wilcoxon rank test를 하여 비교하였다. 자극한 분진의 농도증가에 따른 실험결과의 변화를 보기위해 GLM을 이용하여 경향을 검정하였다.

## 결 과

### 1. 광물성 섬유에서 용출된 철분함량

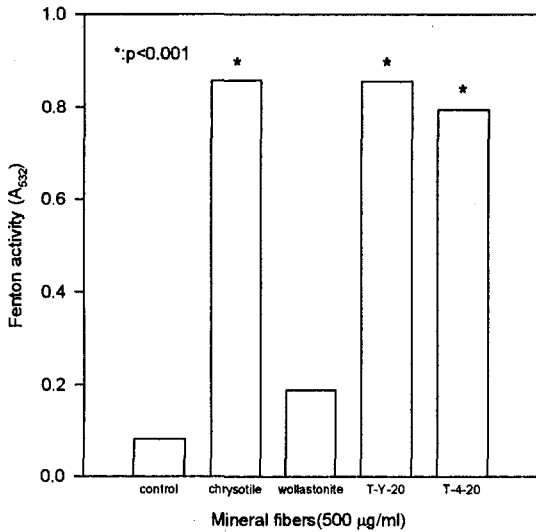
Varian SpetrAA 250 plus를 이용한 atomic absorption 분석결과 백석면 및 테프맥의 철분함량이 규회석에 비해 높게 나타났으며 desferrioxamine으로 광물성 섬유의 철분을 용출시킨 결과 철분함량은 테프맥섬유에서 더 높게 나타났다(Table 2).

### 2. 분진의 fenton activity

광물성 섬유 500 µg/ml의 농도에서 fenton activity를 측정한 결과 PBS 대조군에 비하여 규회석을 제외한 분진군에서 유의하게 증가되었으며(Fig. 1)(p<0.001), 반응분진의 농도가 증가할수록 fenton activity도 유의하게 증가하는 경향을 보였다(Fig. 2)(p<0.05). 모든 광물성 섬유에서 25 mM의 desferrioxamine으로 coating한 분진 1000 µg/ml의 농도를 처치하였을때 fenton activity가 유의하게 감소하였다(Fig. 3)(p<0.05).

Table 2. Extracted iron content of mineral fibers

	Iron content(ppm)	
	Without desferrioxamine	With desferrioxamine
Chrysotile	0.62	27.20
Wollastonite	0.04	0.52
T-Y-20	0.20	48.50
T-4-20	0.34	60.30



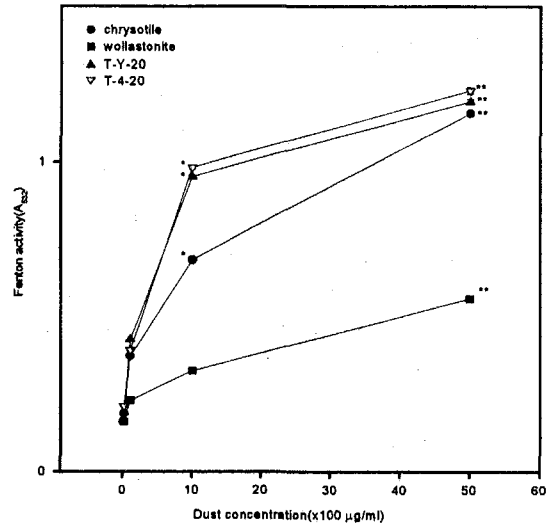
**Fig. 1.** Comparison of fenton activity of mineral fibers. Fenton activities of fibers are compared with media-only(zero-control) group and wollastonite treated group. Fenton activities of TAFMAG, Chrysotile treated group are statistically significantly increased compare with zero-control and wollastonite treated group.

### 3. 적혈구용혈반응측정

각 광물성섬유들의 적혈구용혈반응정도를 용량반응곡선을 그려 비교하였다(Fig. 4). 규회석의 경우 1000 g/ml의 농도까지 거의 변화가 없었으며, 백석면과 테프맥처리군에서 규회석 처리군에 비해 유의하게 높았고(p<0.05 at 100, 1000 g/ml dust concentration), 농도가 증가함에 따라 용혈정도도 비례하여 증가하는 양상을 보였다(p<0.05). 그러나 5000 g/ml의 고농도의 분진농도에서는 통계적으로 유의한 차이는 아니지만 테프맥군이 백석면군보다 용혈반응이 높게 나타났다.

### 4. 광물성섬유에 폭로된 적혈구막의 지질과산화측정

각 광물성 섬유를 500 µg/ml의 농도로 현탁하여 2% 적혈구액에 반응시킨후 세포막의 지질과산화정도를 측정된 결과, 백석면과 테프맥의 두 종류 광물성 섬유군을 처리한 경우 대조군 및 규회석 처리군에 비해 각각 유의하게 증가하였다(p<0.05)(Fig. 5).



**Fig. 2.** Fenton activity of mineral fibers(Dose-response curve). Fenton activities of mineral fibers observed at the dose of 0, 10, 100, 1000, 5000 µg/ml. The fenton activities of all particulates are significantly increased as their concentration increase. There is markedly increased Fenton activity from the dose of 100 µg/ml in chrysotile, TAFMAG group.

\* : Statistically significant at p<0.05 comparing particulate with wollastonite by Wilcoxon rank sum test.

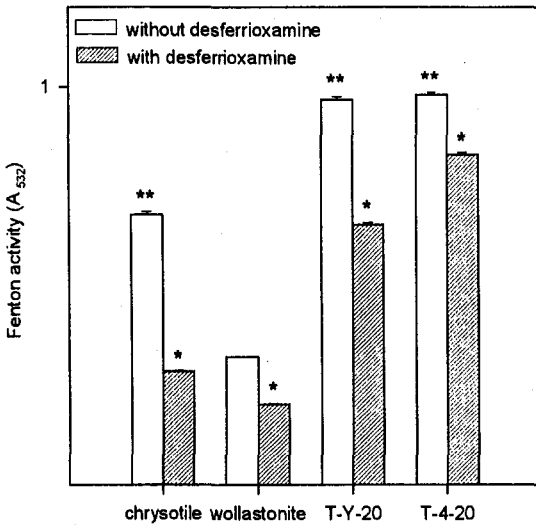
\*\* : Statistically significant linear increase with dust conc. level by GLM trend test.

### 5. RAW세포에 대한 세포독성

같은 농도의 광물성섬유를 사람의 대식세포와 유사한 RAW세포에 처리하였을 때, 백석면 및 테프맥의 독성이 규회석 처리군에 비해 유의하게 높게 나타났다(백석면과 테프맥섬유사이에는 유의하지 않았다)(Fig. 6).

## 고 찰

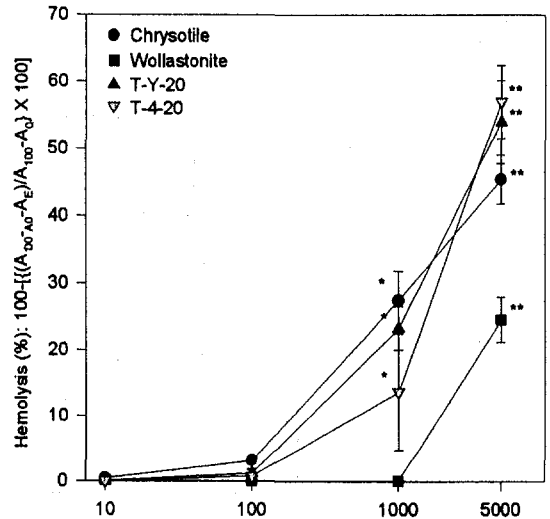
석면은 경제적 공업적인 면에서 대단히 우수한 광물중의 하나이다. 석면의 공업적인 특징에는 내열성, 불연성, 내부식성, 내마모성, 고전기절연성, 내약품성, 내구성, 방직성, 내화성, 고풍장력성 등이



**Fig. 3.** Effect of desferrioxamine on Fenton activity of mineral fiber. Fenton activities of all particulates are decreased with desferrioxamine treatment. But decreasing degree is smaller at Wollastonite and TAFMAG than that of Chrysotile( statistically not significant).

- \* : Statistically significant at  $p < 0.05$  comparing with and without desferrioxamine for each particulate.
- \*\* : Statistically significant at  $p < 0.05$  comparing particulate with wollastonite.

있으며, 이러한 장점으로 인해 제2차 세계대전 무렵부터 석면총생산량이 증가하기 시작해 1960년을 전후하여 사용량이 정점에 달하였다(LaDou 등, 1997). 석면흡입이 폐에 치명적인 질환을 일으킨다는 것은 로마시대부터 알려진 바이지만, 1955년 Doll 등의 역학조사에 의해 석면과 폐암과의 인과관계 규명 이후 지금까지 석면폐증, 폐암, 악성중피종, 늑막여후반 등의 질병이 석면으로 인해 유발된다고 알려져 있다. 다른 광물성 섬유와 마찬가지로 외력을 받았을 때 길이방향(침상구조)으로 쪼개지는 특성이 있으며 생체에 흡입되었을 때 내구력이 강하여 오랜기간동안 폐장에 잔류하는 것으로 알려져 있다. 석면은 형태학적으로 Serpentine type(chrysotile)과 Amphibole type(amosite, crocidolite, tremolite, anthophyllite, actinolite)으로 분류되며, 본실험에는 세포독성이 높은 것으로 알려진



**Fig. 4.** Effect of Mineral dust on RBC hemolysis (dose-response curve). The RBC hemolysis capacity of Chrysotile and TAFMAG is significantly higher than that of Wollastonite at the concentration of 1000, 5000 µg/ml. As the dose increase, hemolysis capacity has increasing trend.

- \* : Statistically significant at  $p < 0.05$  comparing with wollastonite.
- \*\* : Statistically significant linear increase with dust concentration level by GLM trend test.

백석면(chrysotile)이 사용되었다. 발암성 여부에 관한 논란이후 미국과 독일을 시작으로 석면에 대한 광범위한 규제가 강화되었고, 강화된 안전요건으로 인한 부대설비 증설에 대한 제품원가상승 부담으로 석면의 사용은 현저히 감소되고 있다. 이러한 치명적 건강장해를 가져올 수 있는 석면에 대한 대책은 격리공정 및 대체물질 개발 등으로 크게 나눌 수 있다. 격리공정은 가격경쟁력이 취약하고 석면에 대한 각국의 규제가 점차 강화되어가는 추세라 거의 고려되지 않고 있으며 아직까지는 대체물질 개발쪽에 주력하고 있는 실정이다. 석면을 대체하는 물질은 크게 자연산 광물과 인조섬유 등이 있으나 몇가지의 광물성 섬유를 제외하고는 공업적 특성은 석면보다 못한 실정이며 가격 또한 높은 편이다. 따라서 이러한 모든 단점에도 불구하고 석면대체물질을 사용하는 이유는 석면에 대한 건강유해성 때문이라 할것이

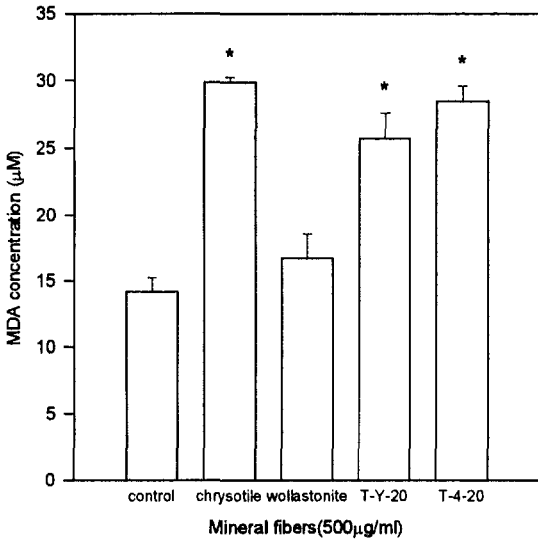


Fig. 5. Lipid peroxidation on RBC membrane exposed to mineral fibers.

\* : Statistically significant at  $p < 0.05$  compared particulate with control group.

다. 최근 석면이나 그 대체물질에 대하여 세포독성과 중간매개물질인 cytokine의 발현, 신호전달체계 및 발암성에 관한 연구에서 이들 물질의 인체건강효과에 대한 보고가 있었다(임 영 등, 1998).

최근 국내건설업 및 제조업체에서는 중국, 동남아 등지에서 행정당국의 집중규제대상인 석면 대신 다른 물질들을 수입하고 있는데, 이들은 아직까지 물리화학적으로 검증되지 않아 이들 물질을 사용하는 근로자들의 건강문제에 대하여 경계를 필요로 한다. 테프맥은 상품명으로 수산화마그네슘( $Mg(OH)_2$ )을 주성분으로 하며, 현재까지 알려진 바에 의하면 중국에서만 발견되는 자연산 광물성섬유로 장섬유상을 보이는 TS군과 단섬유상을 보이는 Y-20, SX, SH 등으로 분류된다. 이들 두가지 형태의 광물질은 동일한 광구에서 채굴되며, 먼저 TS등 수선그레이드를 손으로 채취하고, 그후 나머지 사분암(기선그레이드)을 채굴, 건조, 분쇄, 선별(분급)하여 제조한다. 테프맥은 PBS에 녹였을 경우 매우 끈적끈적한 성질을 가지고 있으며 초음파 충격을 가해도 영김을 풀기가 매우 어려웠다. 따라서 정량하여 실험하는데 적지않은 어려움이 있었다. 테프맥의 광물학적 성상에 대해서는 한국산업안전공단산하 산업화학연구센터에서 Transmission electron microscope equipped

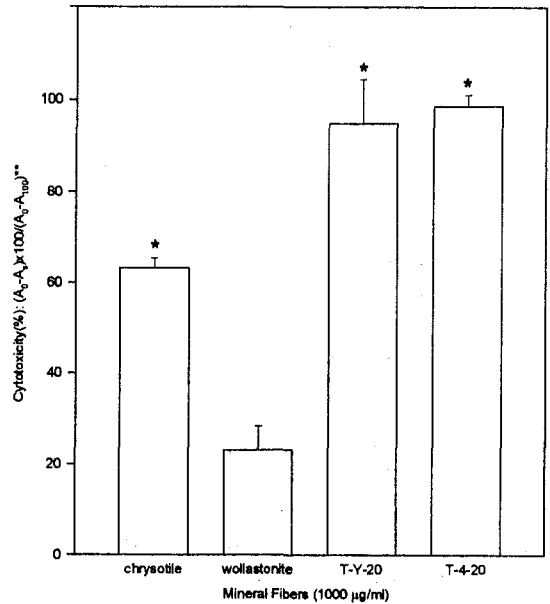


Fig. 6. Cytotoxicity of Mineral fibers on RAW cell.

\* : Statistically significant at  $p < 0.05$  comparing particulate with wollastonite.

\*\* :  $A_0$ ,  $A_{100}$  and  $A_s$  were absorbance at 532 nm of each cell of 0 % lysis, 100 % lysis, and sample.

with energy dispersive X-ray analyzer(TEM-EDX) 분석을 시행한 바(Fig. 7), 형태학적 분석결과 hollow tube구조를 가지고 있었으며, 길이는 2 ~ 5 µm 이상의 섬유상을 나타내었다. 동일 기관에서 시행한 성분분석결과 테프맥의 주성분은 수산화마그네슘이나 규소함량은 chrysotile과 비슷하였으며, 회절분석결과 역시 유사한 양상을 보였다.

광물질의 독성학적 유해성 및 발암성을 추정하는 방법으로 광물성 섬유 내구성 및 물리적 성질, 성분분석 등과 Fenton activity측정, 적혈구 용혈반응, 적혈구세포막 지질과산화반응, 폐상피세포 및 폐포대식세포에서의 세포독성측정 및 지질과산화반응 등과 이들 세포에서 분비하는 cytokine에 대한 분석 등의 다양한 방법이 사용된다. 각 방법들의 유용성 및 섬유형분진의 세포독성과의 상관관계에 대해서는 증명된 바 있다(김경아 등, 1997).

테프맥과 chrysotile, wollastonite는 모두 섬유형 규산염으로, 규산염분진에 의한 세포파괴 및 폐장에 대한 독성을 가져오는 기전중 반응성 산소기가 증

요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 그중  $\cdot\text{OH}$  기는 유전자 독성에 관여하며, 따라서 발암성과 상관이 있을 것으로 믿어지고 있다(Harris 등, 1992). 산소유리기에 의한 세포독성의 지표가 되는 Fenton activity를 다른 광물성 섬유와 비교하기 위해 철분에 대한 분자흡수도 측정 및 hydroxyl radical을 측정된 결과, 테프맥에서 높은 철분함량과 더불어 용량반응의 상관관계를 보였으며 철분함량은 백석면보다 높았다. 그러나 백석면의 경우 desferrioxamine으로 처치하였을 때 Fenton activity가 90%가량의 감소효과를 보이는 것에 반하여 상대적으로 각각 20%, 30% 정도의 낮은 감소효과를 보이는 것에 대해서는 철 이외의 전이금속들이 관여하였을 것으로 추측된다.

섬유형 분진에 의한 생물학적인 효과는 섬유의 길이와 너비 그리고 숫자 등 물리적인 성질이 주요한 영향요인이다. 따라서 본 연구에서는 위상차현미경을 사용하여 실험에 사용된 섬유형 분진의 숫자와 길이의 분포를 조사하였다.

진폐증의 병태생리에 관여하는 세포막 파괴 및 섬유화성 매개물질 분비의 정도를 알아보고자 적혈구를 이용한 지질과산화도와 용혈실험을 시행한 결과 테프맥처리군에서 규회석처리군에 비해 유의하게 높은 지질과산화도를 나타내었으며, 적혈구 용혈반응의 경우 용량반응의 상관관계를 보였다. 세포막의 불포화지방산 또는 지방은 산소유리기, 특히  $\cdot\text{OH}$ 에 의하여 과산화되면 세포막이 파괴되면서 과산화산물이 증가된다. 불포화지방산이나 지방이 과산화되면 일차적으로 hydroperoxide가 생기고 이것이 분해되어서 aldehyde, ketone, alcohol, hydrocarbon, ester, furan 그리고 lactone등이 생긴다. malonaldehyde(MDA)는 hydroperoxide의 중요한 분해산물로서 lipid peroxidation의 직접적인 지표로 알려져 있다(Dalal 등, 1990). 광물성 섬유 및 유리규산염에 의한 Fenton activity, 지질과산화도, 적혈구 용혈정도 등은 상호간의 연관성이 있으며, 세포의 생존률(viability)과도 밀접한 상관관계가 있음이 보고된 바 있다(윤임중, 1998). 실험에 사용된 광물성 분진의 폐포대식세포에 대한 세포독성을 추정하기 위해 사용한 단핵세포주 지질과산화 반응실험에서는 10, 100 g/ml의 농도에서 각 분진별로 별다른 차이를 보이지 않았는데 이는 충분한

농도의 분진을 처리하지 못하였기 때문으로 생각된다. 석면의 대체물질로 중국에서 수입되고 있는 물질중의 하나인 테프맥에 대한 기존의 물리적 분석결과를 토대로 독성분석을 실시한 결과 상기물질은 백석면의 독성에 유사하며, 아직까지 분류되지 않은 새로운 종류의 석면-지역적 특수성을 갖는일 가능성이 높다고 생각된다.

본 연구는 in vitro의 연구결과로 실제 생체에 대한 세포독성을 정확히 반영하지 못했다는 것과 원재료를 얻지 못하고 상품화된 TAFMAG 섬유를 구하여 사용하였기 때문에 표준화된 시료를 이용할 수 없었다는 것이 제한점으로 사료된다. 분진에 의한 세포독성에는 물리적인 성질과 형태학적인 특성이 영향을 미치므로, 향후 표준화된 섬유를 사용하여 in vivo 실험 등의 연구를 통한 구체적인 독성평가가 이루어져야 할 것으로 생각된다. 또한 앞서 언급한 바와 같이 계수되지 않은 섬유형 분진의 개수가 실험 결과의 해석에 영향을 미칠 수 있어서 본 연구의 제한점으로 작용할 것으로 사료되어 전자현미경적 계수 분석을 보완하여 이를 보정한 연구가 필요하다고 생각된다.

## 요 약

목적 : 석면 대체물질로 수입되어 사용되고 있는 테프맥의 생체세포에 미치는 독성을 알아보고자 하였다.

방법 : In vitro에서 분진의 Fenton activity 측정, 적혈구 용혈반응, 적혈구 세포막에 대한 지질과산화도 측정 및 RAW 264.7세포에 대한 세포독성 등을 실험하여 백석면 및 규회석의 실험결과와 비교하였다.

결과 : 테프맥의 Fenton activity를 측정된 결과 대조군 및 규회석에 비해 유의한 증가를 보였고 처리한 분진의 농도가 높을수록 Fenton activity도 증가하는 양상을 보였다. 적혈구 용혈반응정도를 관찰한 결과 1,000 g/ml의 농도까지 테프맥 및 백석면처리군에서 규회석처리군에 비해 유의한 상승을 보였으며, 5,000 g/ml의 고농도처리시에는 테프맥처리군이 백석면보다 높은 용혈반응을 보였고, 적혈구 세포막에 대한 지질과산화도는 테프맥 및 백석면 처리군에서 대조군 및 규회석 처리군에 비해 유의한



상승을 관찰할 수 있었다.

폐포대식세포에 대한 광물성 섬유 영향의 추정하기 위해 세포독성검사를 시행한 결과, 백석면 및 테프맥의 단핵세포주에 대한 세포독성은 규칙석처리군에 비해 유의하게 높게 나타났다.

결과 : 이상의 광물성 섬유 세포독성여부에 관한 실험관 모형의 실험결과를 종합하면, 테프맥은 백석면과 유사세포독성을 나타내어 이로인한 추후 생체효과에 대한 연구가 필요하다고 생각된다.

### 참고문헌

김경아, 석면관련 질환과 폐장내 잔류 석면. 한국의 산업의학 1995;34(3):75-79.

김경아, 임 영, 김주영, 김지홍, 장황신, 박정일, 윤임중. 진폐증 치료제의 임상적 응용 및 개발에 관한 연구. 한국의 산업의학 1998;37:55-70.

김경아, 임 영, 김지홍, 장황신, 박정일, 윤임중, 오민화. 광물성 섬유의 수산이온기 생성이 권취 폐포대식세포의 세포독성과 적혈구 세포막의 지질과산화에 미치는 영향. 대한산업의학회지 1997;9:401-410.

김지원, 안형숙, 김경아, 임 영, 윤임중. 석면취급 근로자에서 늑막비후가 폐기능에 미치는 영향. 결핵 및 호흡기 질환 1995;42:923-933.

노동부. 유해물질의 허용농도. 서울: 노동부고시 제 91-21 호 1991.

윤임중. 진폐증의 최신지견. 서울: 가톨릭대학교 의과대학 산업의학연구소, 1998.

임 영, 김경아, 김홍남, 이동원, 조원섭, 윤임중. 유리규산, 석면 그리고 인조섬유에 의한 세포독성 및 Apoptosis. 대한산업의학회지 1997;9:641-649.

임 영, 김경아, 윤임중. 진폐증의 발생기전에 대한 분자생물학적 연구. 한국의 산업의학 1998;37:41-52.

정장영, 안형숙, 김지원, 김경아, 윤임중, 김한옥, 최영미, 송정섭. 석면분진폭포에 의하여 석면폐증과 늑막삼출액 폐암이 합병된 1예. 결핵 및 호흡기 질환 1994;41:651-657.

조규상. 진폐증. 서울: 최신의학사, 1985.

한정희, 정용현, 이준연, 이용득, 유일재. 에너지 분산 X 선 분석장치가 장착된 전자현미경(TEM-EDX)을 이용한 석면대체물질의 분석사례보고. 한국산업위생학회 1998년도 추계학술대회 초록집 1998:24.

尾添 博. 中央労働災害防止協會. 石棉代替纖維とその生體影響. 東京: 1996.

Adachi S. Tumorigenicity of fine MMMF after intratracheal administrations to hamsters. Env research 1991;54(1):52-73.

Begin R, Cantin A, Masse S. Recent advances in the pathogenesis and clinical assessment of mineral dust pneumoconioses: asbestosis silicosis and coal pneumoconiosis. Eur Respir J 1989;2:988-1001.

Burdett GJ, Kenny LC, Ogden TL, Rood AP, Shenton-Taylor T, Tarry R, Vaughan NP. Problems of fibre counting and its automation. In: Biological effects of man-made mineral fibres. Proceedings of a WHO/IARC Conference, Copenhagen, Denmark, 20-22 April 1982, Copenhagen, World Health Organization, Regional Office for Europe 1984:201-216.

Cochrane CG. Cellular injury by oxidants. Am J Med 1991;91(suppl 3C):23s-30s.

Dalal NS, Shi X, Vallyanthan V. Role of free radicals in the mechanisms of hemolysis and lipid peroxidation by silica: comparative EST and cytotoxicity studies. J Toxicol Environ Health 1990;29:307-316.

Donaldson K, Shought J, Hannant D, Bohon RE. Increased release of hydrogen peroxide and superoxide anion from asbestos primed macrophage. Inflammation 1985;9:139-147.

Freeman BA, Crapo JD. Free radicals in tissue injury. Lab invest. 1982;47:412-426.

Gutteridge JMC, Richmond R, Halliwell B. Inhibition of the iron-catalysed formation of hydroxyl radicals from superoxide and of lipid peroxidation by desferrioxamine. Biochem J 1979;184:469-472.

Halliwell R, Gutteridge JMC. Oxygen free radical and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. Arch Biochem Biophys 1986;246:501-514.

Harley, S.L., Fitzsimons, I.C.W., Buick, I.S. and Watt, G. The significance of reworking, fluids and partial melting in granulite metamorphism, east Prydz Bay, Antarctica. In: Yoshida, Y. et al. (Ed.). Recent Progress in Antarctic Earth Science 1992:119-127.

Harris CC. Tumour suppressor genes, multistage carcinogenesis and molecular epidemiology. In: Mechanisms of Carcinogenesis in Risk Identification(Vainio H, Magee P, McGregor DB, McMichael AJ, eds). IARC Scientific Publications No 116. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1992:67-85.

Imlay JA, Linn S. DNA damage and oxygen radi-

- cal toxicity. *Science* 1988;240:1302-1309.
- J. Ladou, R.J. Jackson, J. Howard. Environmental exposures and controls. In: Ladou J, Editor. *Occupational and Environmental Medicine*. 2nd ed. Stamford: Appleton & Lange, 1997:647-663.
- Kamp DW, Gracefla P, Pryor WA, Weitzman SA. The role of free radicals in asbestos-induced disease. *Free Radic Biol Med* 1992;12:293-315.
- Kennedy TP, Dodson R, Rao NV, Ky H, Hopkins C, Baser M, Tolley E, Hoidal JR. Dusts causing pneumoconiosis generate  $\cdot\text{OH}$  and produce hemolysis by acting as Fenton catalysts. *Arch Biochem Biophys* 1989;228:373-376.
- L. Christine Oliver. Asbestos in Public Buildings. In: Rom WN, Editor. *Environmental and Occupational Medicine*. 3rd ed. Boston: Little, Brown and Company, 1998:387-395.
- Lockey JE. Man-Made Fibers and Nonasbestos Fibrous Silicates. In: *Occupational and Environmental Respiratory Disease*, P Harber, MB Schenker, JR Balmes (eds). St. Louis: Mosby-Year Book, Inc., 1996.
- McConnel EE, Wagner JC, Skidmore JW, Moore JA. A comparative study of the fibrogenic and carcinogenic effects of UICC canadian chrysotile B asbestos and glass microfibre (JM100). In: *Biological effects of man-made mineral fibres. Proceedings of a WHO/IARC Conference*, Copenhagen, Denmark, 20-22 April 1982, Copenhagen, World Health Organization, Regional Office for Europe 1984; Vol. 2:234-252.
- Michael J Bennett. *The Asbestos Racket (An Environmental Parable)*. Washington: Believe, 1991.
- M Meldrum. *Review of Fibre Toxicology*. England: HSE, 1996.
- Raymond F.Hamilton, Li Li, Rashi Iyer, Andrij Holian. Asbestos induces apoptosis in human alveolar macrophages. *Am J Physiol* 1996;271:L813-L819.
- Schapiro RM, Ghio AJ, Effros RM, Morrissey J, Dawson CA, Hacker AD. Hydroxyl radical are formed in the rat lung after asbestos instillation in vivo. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994;10:573-579.
- Si X, Dalal NS, Vallyathan V. ESR evidence for the hydroxyl radical formation in aqueous suspension of quartz particle and the possible significance to lipid peroxidation in silicosis. *J Toxicol Environ Health* 1988;25:237-245.
- Thomas P. Kennedy, Ronald Dodson, N.V. Rao, Henry KY, Christopher Hopkins, Michael Baser, Elizabeth Tolley, John R. Hoidal. Dusts Causing Pneumoconiosis Generate  $\cdot\text{OH}$  and Produce Hemolysis by Acting as Fenton Catalysts. *Arch Biochem Biophys* 1988;269(1):359-364.
- Vallyanthan V, Shi X, Dalal NS, Irr W, Castranova V. Generation of free radicals from freshly fractured silica dust. *Am Rev Respir Dis* 1988;138:1213-1219.
- Victor L. Roggli. Fiber Analysis. In: Rom WN, Editor. *Environmental and Occupational Medicine*. 3rd ed. Boston: Little, Brown and Company, 1998:335-347.
- Weitzman SA, Gracefla P. Asbestos catalyzes hydroxyl and superoxide radical generation from hydrogen peroxide. *Arch Biochem Biophys* 1984; 228:373-376.
- William N. Rom. Asbestos-Related Diseases. In: Rom WN, Editor. *Environmental and Occupational Medicine*. 3rd ed. Boston: Little, Brown and Company, 1998:349-375.