

연구보고서

LCD 제조공정 세척제 (N-methylformamide)의 생체 영향 연구

이미주 · 임경택 · 김용순 · 차효근 · 유병욱

산업재해예방

안전보건공단

산업안전보건연구원



요 약 문

연구기간

2019년 01월 ~ 2019년 11월

핵심단어

N-methylformamide, 독성, 랫드, 조직병리학적 특징 분석

연구과제명

LCD 제조공정 세척제(N-methylformamide)의 생체영향 연구

1. 연구배경

N-methylformamide는 많은 사용량과 다양한 사용방법에 비해 독성 연구자료가 부족함. 이에, 내부적으로 흡입독성시험을 실시하여, 조직병리학적 변화가 관찰된 간, 비강, 침샘, 수컷 고환, 암컷 자궁 등에 대해 형태적 특징을 분석하고, 변화의 원인을 확인하고자 하였음. 추가적으로, 조직병리학적 변화는 없었으나 노출경로인 폐에 대해서도 조직병리학적인 기법을 활용하여 형태적인 변화 여부를 분석하였음.

2. 주요 연구내용

- 연구결과

- 1) NMF 고농도 노출 시 대조군 대비 체중이 감소하였음.
- 2) 조직병리학적으로 간에서는 간세포 창백/비대 및 색소 침착 소견이 관찰되었는데, 창백/비대는 대사효소인 cytp450 2E1의 발현과 관련이 있었고, 색소침착은 iron 염색을 통해 헤모시더린으로 확인됨.
- 3) 비강은 출혈, 이행상피 및 점액세포 과형성, 염증 등이 관찰되었는데,

cytP450 2E1의 발현은 동반되지 않았으며, AB-PAS 양성 반응의 증가로 점액세포 과형성(13주)과 caspase-3 발현(13주)을 통해 세포자살을 확인하였고, Trichrome 염색성 증가(13주)로 회복도 동시에 일어남을 확인하였음

- 4) 침샘은 악하선 및 이하선에서 선방세포의 비대가 관찰되었으며, caspase-3, Trichrome, AB-PAS 등의 검사에서는 대조군과 차이가 없었음
- 5) 노출경로인 폐에서는 Trichrome 및 AB-PAS 염색결과 섬유아세포 증식이나 점액세포 과형성 등은 관찰되지 않았음
- 6) 수컷 고환은 조직병리학적으로 7단계 생식세포의 변성이 관찰되었으며, PAS 염색결과에서도 그 외의 변화는 확인되지 않았음
- 7) 암컷 생식기는 조직병리학적으로 위축이 관찰되었으며, AB-PAS에서 점액세포의 변화나 혈중 estradiol의 농도 변화가 관찰되지 않았음

- 시 사 점

- 1) 간 병변은 대사 효소인 cytP450 2E1의 발현과 관련이 있음
- 2) 비강의 병변은 cytP450 2E1의 발현과는 관련이 없고, 90 ppm으로 장기간 노출 시 세포자살도 동반되며, 손상과 함께 회복도 일어남
- 3) 침샘 병변은 선방세포 과형성이 아닌 선방의 점액분비 증가에 기인함
- 4) 비강 병변의 원인은 cytP450 2E1과는 관련이 없음
- 5) 폐에서는 NMF에 기인한 병변이 유발되지 않음
- 6) 수컷 생식기의 변화는 체중감소와 관련이 있으며, 암컷 생식기의 변화 원인을 규명하기 위해서는 추가 연구 필요

3. 연구 활용방안

- 제 언: 작업장내 노출기준 설정을 위한 추가적인 연구 필요

- 활 용: 학술지 및 유관학회(독성병리학회, 환경독성보건학회, 독성학회 등) 발표를 통해 추가 연구를 위한 근거 제공

4. 연락처

- 산업안전보건연구원 흡입독성연구센터 병리검사부 이미주
- ☎ 042) 869. 8533
- E-mail: mjlee@kosha.or.kr

차 례

I. 서론	1
1. 연구배경	1
2. 연구목적	3
II. 연구 방법	5
1. 실험동물 및 사육환경	5
2. 시험물질의 흡입 노출	5
3. 체중 및 사료섭취량 측정	6
4. 혈액 채취 및 조직병리학적 검사	6
5. 특수염색	7
6. 면역조직화학분석	7
7. 주사전자현미경 분석	7
8. ELISA 분석	8
9. 통계 분석	8
III. 연구 결과	11
1. 체중 및 사료 섭취량	11
1) 체중	11
2) 사료섭취량	11
2. 조직병리학적 검사	11
1) 2주 노출 시험	11

2) 13주 노출 시험	12
3. 특수염색	19
4. 면역조직화학 분석	28
5. 주사전자현미경 분석	37
6. ELISA 결과	38
 IV. 고찰	 41
 V. 결론	 47
 참고문헌	 49
 Abstract	 53

표 차 례

<표 1> 2주 노출시험에서 관찰된 조직병리학적 변화	13
<표 2> 13주 노출시험에서 관찰된 조직병리학적 변화	14
<표 3> 2주 시험의 양성반응 발현 정도	28
<표 4> 13주 시험의 양성반응 발현 정도	29

그림 차례

[그림 1] 간의 조직병리학적 변화	15
[그림 2] 간의 조직병리학적 변화2	16
[그림 3] 비강의 조직병리학적 변화	17
[그림 4] 침샘의 조직병리학적 변화	18
[그림 5] 비강의 trichrome 염색 결과	20
[그림 6] 비강의 AB-PAS 염색 결과	21
[그림 7] 침샘(이하선)의 AB-PAS 염색 결과	22
[그림 8] 침샘(악하선)의 AB-PAS 염색 결과	23
[그림 9] 자궁의 AB-PAS 염색 결과	24
[그림 10] 침샘(이하선)의 AB 염색 결과	25
[그림 11] 침샘(악하선)의 AB 염색 결과	26
[그림 12] 고환의 PAS 염색 결과	27
[그림 13] 면역조직화학검사 결과: 간 cytp450 2E1	30
[그림 14] 면역조직화학검사 결과: 비강 cytp450 2E1	31
[그림 15] 면역조직화학검사 결과: 이하선 PCNA	32
[그림 16] 면역조직화학검사 결과: 악하선 PCNA	33
[그림 17] 면역조직화학검사 결과: 간 caspase-3	34
[그림 18] 면역조직화학검사 결과: 비강 caspase-3	35
[그림 19] 면역조직화학검사 결과: 침샘(이하선) caspase-3	36
[그림 20] 주사전자현미경 분석	37
[그림 21] 2주 노출 시험의 암컷 혈중 estradiol 농도	38

[그림 22] 2주 노출 시험의 암컷 혈중 estradiol 농도	39
[그림 23] 간 세포 비대의 원인 및 감별진단 모식도	42
[그림 24] 침샘 선방세포 비대의 원인 및 감별진단 모식도	44

I. 서론

1. 연구배경

N-methylformamide(NMF)(CAS No.123-39-7)는 N-methyl 치환기를 가지는 formamide class에 속하며, formamid로부터 유도되는 화학물질이다. 끓는점 180-185℃, 녹는점 -5.4℃이며(Budavari, 1996), 아세톤과 에탄올에 잘 녹으며(Lide and Milne, 1994), 물에도 용해성이 있다. 밀도는 25℃에서 0.9962 g/cm³이며(Budavari, 1996), 증기의 상대밀도는 2.04(공기1), 증기압은 25℃에서 0.253 mmHg, 옥탄올/물 분배계수는 -0.97 (Hansch et al., 1995)이다. 투명하고 색깔이 없는 액체이며, 약한 아민 냄새가 난다(National center for biotechnology information, 2005).

NMF는 LCD용 박리액, 농약 등의 유기물 합성, 항암제의 adjuvant 등으로 사용되며, 염료, 향수, 전기분해 및 전기 도금 산업 등에서도 광범위하게 사용된다(김기웅 등, 2016;National center for biotechnology information, 2005). NMF의 연간 유통량은 2014년 국내 기준 17,036톤(최상준 등, 2017)정도 이다.

NMF는 랫드의 2주 흡입 노출 결과로서 간세포의 세포질 창백, 분열상 증가, 세포질공포화 등이 보고되었다(Kennedy et al, 1990). *In vitro* 시험결과에서는 간세포에서 LDH 증가 등이 유발되었다(Shaw et al, 1988). NMF는 간에서 대사과정을 거치는 것으로 알려져 있다(Threadgill et al, 1987; Pearson et al, 1987; Tulip and Timbrell, 1988). NMF는 마우스에서 주로 이산화탄소와 methylamine으로 대사되는데, 이산화탄소는 호흡과정에서 호기를 통해 배출되고, methylamine은 뇨를 통해 배설된다. N-acetyl-S-(N-methylcarbamoyl)

cysteine 또한 NMF의 주요한 대사산물로서 마우스, 랫드 등의 노에서 확인되었다(Buhler and Reed, 1990).

체내로 유입된 물질은 배설되기 전에 좀 더 수용성인 형태로 생체내에서 대사(metabolism)되거나 생체 내 변화(biotransformation)을 거쳐야한다. 이러한 생체내변화는 크게 1상(phase I)과 2상(phase II)으로 구분된다. 1상 대사에서는 물질의 가수분해(hydrolysis), 환원(reduction), 산화(oxidation)가 일어나며, 이 과정 후에 결과적으로 아미노기(amino group, $-NH_2$), 싸이올기(thiol group, $-SH$), 수산기(hydroxyl group, $-OH$), 카르복시기(carboxyl group, $-COOH$) 등의 작용기가 붙거나 탈락된다. 1상 대사의 주요한 점은 cytochrome(Cyt)P450 효소에 의한 촉매이다. CytP450은 사람에서만 57종의 아종이 확인되었으며, 대표적으로는 cytP450 1A, cytP450 2A, cytP450 2B, cytP450 2C, cytP450 2D, cytP450 2E, cytP450 3A, cytP450 4A 등이 있다. CytP450의 농도는 간에서 가장 높고, 따라서 cytP450에 의한 대부분의 생체변환은 간에서 일어난다(Smith et al, 2013). 그 중 cytP450 2E1, 1A 등은 외인성 물질이 체내로 유입되었을 때 활성화되는 대표적인 대사효소이다(Guengerich, 2006). CytP450 등의 간 대사 효소가 활성화되면 간 중량의 증가와 함께 조직병리학적으로는 소엽중심성의 간세포 비대가 관찰되는 경우가 많다(Hall, 2013; Cattley et al., 2013). 간 미소체효소(microsomal enzyme)의 유도는 흔한 현상이며, 한 물질의 간 미소체효소의 유도 및 억제 는 사람의 적용에 있어 주요한 부분이다. 그 외에 1상 대사와 관련된 효소에는 monooxygenase, 알데하이드탈수소효소, 니트로환원효소, 에스테르분해효소 등이 있다(伊東信行, 1998). 2상 대사는 2단계로 나뉘는데, 1단계에서는 내인성 혹은 외인성 물질의 고에너지화합물이 생성되며, 2단계에서는 포합체가 생긴다. 일차적으로 글루쿠론산포합(glucuronidation), sulfation, 글루타치온포합(glutathione conjugation), 류산포합, 아실포합 등의 포합(conjugation) 반응이 일어나며, 그 외에도 methylation, acetylation, amino acid conjugation 등이 있다. 이 중 글루쿠론산 포합은 고양이 를 제외한 모든 포

유류에서 주요한 2상 대사 과정이다. 글루타치온포합은 친전자성 화합물 (electrophilic compound)의 해독과 관련이 있다. 글루타치온 포합체는 간에서 형성되며, 담즙으로 배설된다 (Krishan and White. 2013; 伊東信行, 1998). 대부분의 경우에, 포합반응은 외부유입물질의 해독과 배설을 촉진하지만, 오히려 대사의 결과물이 원체보다 더 독성을 나타내는 경우도 있다(Guengerich, 2006). NMF가 유발하는 간독성의 기전은 NMF의 간 대사시에 생성되는 대사물질에 기인한 것으로 여겨지고 있다. 그 근거로는 NMF는 간(in vivo) 및 간세포(in vitro)의 glutathione을 결핍시키고, NMF 대사물질은 간 마이크로솜 단백질과 공유결합을 하며, 마우스에 cysteine이나 N-acetylcysteine을 미리 투여함으로써 NMF에 의한 간독성을 예방할 수 있다(Buhler and Reed, 1990)는 점 등이 제기되고 있다. 그러나 알려진 독성과 기전에 대한 정보만으로는 독성시험에서 관찰된 형태적 변화를 이유를 설명하기는 어렵다.

다양한 사용처와 많은 사용량에도 불구하고, NMF는 산업독성분야에서 DMF의 노출 생체지표 정도로만 인식되어져 왔다. 동물 및 실험관 시험(in vivo)에서 간 독성이 있는 것으로 보고되었으나, 배태자 독성이외에는 알려져 있지 않고, 노동자에 대한 노출허용농도도 설정되어 있지 않다. 이에 본 연구원 흡입독성센터에서 NMF에 대하여 2주 및 13주 흡입독성시험을 실시하였고, 그 결과 간 이외에도 비강, 침샘 등에서 NMF노출에 기인한 변화가 관찰되었다. 본 연구에서는 상기 독성시험에서 관찰된 조직병리학적 변화의 형태적 특징을 분석하여 변화의 원인을 확인하고, 추가적인 독성 정보를 제공하고자 하였다.

2. 연구목적

산업계 전반에 걸친 다양한 사용처와 연간 17,000톤 정도의 많은 사용량에도 불구하고, NMF는 산업독성분야에서 DMF의 노출 생체지표 정도로만 인식되어져 왔다. 이에 본 연구원 흡입독성센터에서 NMF의 2주 및 13주 흡입독성시험

에서 조직병리학적 변화가 관찰된 간, 비강, 침샘, 고환, 자궁 등의 형태적인 특징을 분석하여 기전연구를 위한 기초 정보 및 추가적인 독성 정보를 제공하고 자 하였다.

II. 연구 방법

1. 실험동물 및 사육환경

본 연구에 이용된 실험동물은 특정병원체 부재(specific pathogen free, SPF)의 F344/NSlc계 랫드로서 2주 노출 시험을 위해 암수 각 20마리, 13주 노출 시험을 위해 암수 각 40마리씩을 (주)중앙실험동물의 중개로 Japan SLC, Inc.(Shizuoka, Japan)에서 구입하였고, 2~3주의 순화기간을 거친 후 실험에 사용하였다. 사육시설은 온도 $22\pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50\pm 20\%$, 환기회수 10~20회/시간, 명암주기 조명 12시간, 조도 150~300 Lux로 유지되었고, 6연식 철망케이지(W310×L1200×H200 mm)에 사육상자당 1마리씩 수용하였다. 사료는 감마선으로 멸균된 실험동물용 고체 사료(Teklad Certified Irradiated Global 18% Protein Rodent Diet®, Envigo Co. Ltd., Cambridgeshire, UK)와, 미세 여과기($10\ \mu\text{m}$, $1\ \mu\text{m}$)와 자외선 유수살균장치로 살균한 상수도수를 자유 급여하였다. 본 연구는 산업화학연구실 동물실험윤리위원회의 승인(2주 노출시험: IACUC-1823, 13주 노출시험: IACUC-1818)을 받아 수행되었다.

2. 시험물질의 흡입 노출

2주 노출 시험에서는 대조군, 30, 100, 300 ppm 노출군에 암수 각 5마리씩을 배정하였고, 13주 노출시험에서는 대조군, 10, 30, 90 ppm 노출군에 암수 각 10마리씩 배정하였다. 시험물질인 N-methylformamide(NMF)는 하루 6시간, 주 5회, 2주 및 13주간 노출하였다. 시험물질인 NMF를 가스발생기(Liquid vapor

generator, LVG-04-A, HCT Co., South Korea)내의 시료 용기에 넣고 증기(vapor)를 발생시켰다. 발생된 NMF 증기는 흡입챔버 입구에서 청정공기와 혼합하여 동물에 노출시켰다. 대조군의 랫드는 청정공기(fresh air)에만 노출되었다. 연구에 사용된 흡입 챔버는 전신노출흡입챔버(1.4 m³, whole body chamber)로서 온도 19~25℃, 상대습도 30~70%, 차압 -40 Pa 이하, 환기 10~15 회/시간, 산소농도 19% 이상으로 유지되었다.

3. 체중 및 사료섭취량 측정

2주 및 13주 노출시험의 모든 개체에 대해 체중 및 사료섭취량을 측정하였다. 체중은 노출개시일, 노출기간 중 2회/주, 부검당일에 절식체중을 측정하였다. 사료섭취량의 측정은 노출기간 중 1회/주 실시하였으며, 측정일에 동물별로 칭량하여 개체당 일일 평균 섭취량(g/animal/day)을 산출하였다.

4. 혈액 채취 및 조직병리학적 검사

혈중 호르몬 농도 측정을 위하여, 암컷 모든 개체에 대해 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 실온에서 90분 이상 방치시킨 후 원심분리(약 3000 rpm, 10 분, 4℃)하여 혈청을 분리하였다.

조직병리학적 검사를 수행하기 위하여 모든 동물의 간, 비강, 침샘, 폐, 고환, 난소 조직을 적출하였다. 적출한 간, 비강, 침샘, 폐, 고환, 난소 조직은 10% 중성 포르말린(neutral buffered formalin, NBF)에 고정하였다. NBF에 고정된 장기·조직은 적절한 크기로 삭정 후 파라핀에 포매하고 2-4 μ m 두께로 박절한 뒤 Hematoxylin & Eosin (H&E) 염색을 실시하였다. 제작된 조직표본에 대한 조직병리학적 검사는 광학현미경(Scope.A1, Zeiss, Oberkochen, German)으로 실시하였다. 노출기간 도중 사망한 동물은 본 연구에서 제외하였다.

5. 특수염색

파라핀 포매된 간 조직을 3-4 μm 두께로 박절하였다. 각 조직의 형태적 특징을 규명하기 위해 Trichrome, Alcian blue(AB)-Periodic acid Schiff (PAS), PAS, AB, Iron 염색 등을 실시하였다. 특수염색은 자동면역염색기기 (BenchMark Special Stains, Roche, Basel, the republic of Finland)를 이용하여 실시하였다.

6. 면역조직화학분석

파라핀 포매된 간 조직을 3-4 μm 두께로 박절하였다. 간, 비장 등에서의 간 대사 효소의 활성 여부를 확인하기 위하여 cyt P450 2E1 항체를 이용하여 면역조직화학염색을 실시하였다. 침샘에서의 증식성을 확인하기 위해 PCNA 항체, 세포 자살을 확인하기 위해 비장 및 침샘에서 caspase-3 항체를 이용하여 면역조직화학염색을 실시하였다. 면역조직화학염색은 자동면역염색기기 (Ventana XT, Roche, Basel, the republic of Finland)를 이용하였다. 본 연구에서 사용한 일차항체의 반응 조건은 다음과 같다. 1) rabbit anti-cytochrome P450 2E1 (abcam, 1:100, 2시간 반응), 2) rabbit anti-PCNA (abcam, 1:6000, 1시간 반응), 3) rabbit anti-caspase-3 (abcam, 1:1000~1500, 1시간 반응). 그 결과는 광학현미경(Scope.A1, Zeiss, German)을 이용하여 양성 반응의 발현 강도와 면적에 따라 0~3점을 부여하여 그 정도를 나타내었다.

7. 주사전자현미경 분석

고환 미세구조의 손상을 확인하기 위하여 1 mm^3 크기로 조직을 세절한 후,

조직처리기(EM-TP, Leica, Wetzlar, Germany)를 이용하여 전자전미경용 검체를 제작하였다. 조직처리를 위하여 0.1M phosphate를 이용해 완충된 2.5% glutaraldehyde(pH 7.4)에 고정하고 수세 후에 1% OsO₄용액에 2차 고정하였다. 50% 에탄올, 70% 에탄올, 80% 에탄올, 95% 에탄올 등 단계별 에탄올로 탈수 후 T-butyl alcohol로 치환하였다. 동결건조기(FD8505 IIShin, Dongducheon, Republic of Korea)로 조직처리된 시료를 동결건조 후 금 코팅을 하고(E-1010, Hitachi, Tokyo, Japan), 주사전자현미경(S-3000N, Hitachi, Tokyo, Japan)으로 검경 후 사진을 촬영하였다.

8. ELISA 분석

혈청을 이용하여 혈중의 estradiol 농도를 측정하였다. 랫드용 estradiol kit(rat estradiol ELISA, BioVendor, Brno, Czech Republic)를 사용하였고, 사용법에 제시된 절차대로 수행하였다. 흡광도는 450 nm에서 Hybrid Multi-Mode Reader (Synergy H1, BioTek Instruments, Inc., Vermont, USA)와 연동된 프로그램(Gen5™ 3.0, BioTek Instruments, Inc., Vermont, USA)을 사용하여 측정하였다.

9. 통계 분석

대조군과 NMF 노출군과의 차이를 분석하기 위하여 체중, 면역염색, ELISA 분석 결과에 대해 PASW Statistics 18(Version 18, SPSS Inc., Illinois, USA) 프로그램을 사용하여 통계 분석을 실시하였다. 체중은 Levene test로 등분산성을 검정한 뒤, 등분산성이 인정되면 일원분산분석(one-way analysis of variance, ANOVA)을 실시하였고, 차이가 인정되면 Dunnett 검정을 실시하였다. 등분산성이 기각되면 Kruskal-Wallis 검정을 실시하였다. 면역염색 결과는

Shapiro-Wilk 검정법으로 정규성을 검정한 후, 정규성이 인정되면 Levene test로 등분산을 검정하고, 등분산성이 인정되면 독립표본 T-검정(t-test)를, 등분산성이 기각되면 Kruscal-Wallis 검정을 실시하였다. ELISA 결과는 Shapiro-Wilk 검정법으로 정규성을 검정한 후, 정규성이 인정되면 Levene test로 등분산을 검정한 후, 등분산성이 인정되면 ANOVA로 검정하고, 유의성이 인정되면 Dunnett 검정을 실시하였다. 등분산성이 기각되면 Welch's ANOVA 검정 후 Games-Howell 검정을 실시하였다.

III. 연구 결과

1. 체중 및 사료섭취량

1) 체중

2주 노출 시험에서는 노출 6~13일에 암수 300 ppm 노출군에서 유의한 ($p<0.01$) 체중감소가 관찰되었다. 13주 노출 시험에서는 암수 90 ppm 노출군에서 노출 3일부터 유의한($p<0.05$ 혹은 $p<0.01$) 체중 감소 혹은 감소 경향이 관찰되었다.

2) 사료섭취량

2주 노출 시험에서는 노출 1주 및 2주에 암수 300 ppm 노출군에서 사료섭취량의 유의한($p<0.01$) 감소가 관찰되었다. 또한 노출 2주에 암컷 100 ppm 노출군에서 사료섭취량의 유의한 ($p<0.01$) 감소가 관찰되었다. 암수 90 ppm 노출군에서 노출 3일부터 유의한($p<0.05$ 혹은 $p<0.01$) 감소가 관찰되었다. 수컷 30 ppm 노출군에서는 노출 24일, 31일 및 38일에 유의한($p<0.05$) 감소, 수컷 10 ppm 노출군에서는 노출 45일에 유의한 ($p<0.05$) 감소가 관찰되었다. 암컷 30 ppm 노출군에서는 노출 59 및 66일에 유의한 ($p<0.01$) 감소가 관찰되었다.

2. 조직병리학적 검사

1) 2주 노출 시험

300 ppm 노출군의 암컷 2마리가 노출기간중 사망하였다. 사망개체는 본 연구에서 제외하였다. 간에서는 암수 300 ppm 노출군에서 간세포의 세포질 창백(pale cytoplasm), 암컷 300 ppm 노출군의 간에서 쿠퍼세포의 색소침착(pigmentation)이 소엽중심성으로 관찰되었다. 비강에서는 수컷 300 및 암수 100 ppm 노출군에서 단핵구성 세포침윤(cell infiltration, mononuclear)이 관찰되었다. 암수 300 ppm 노출군에서 비갑개의 출혈(hemorrhage) 및 비갑개 이행상피의 과형성(hyperplasia, transitional cells)이 관찰되었다. 또, 수컷 300 ppm 노출군에서 이행상피의 미란/궤양(erosion/ulcer)이 관찰되었다. 악하선에서는 암수 300 및 100 ppm 노출군, 수컷 30 ppm 노출군에서 선방세포의 비대(hypertrophy, acinar cell)가 관찰되었다. 조직병리학적 검사 결과는 표 1 및 그림1에서 그림4까지에 나타내었다.

2) 13주 노출 시험

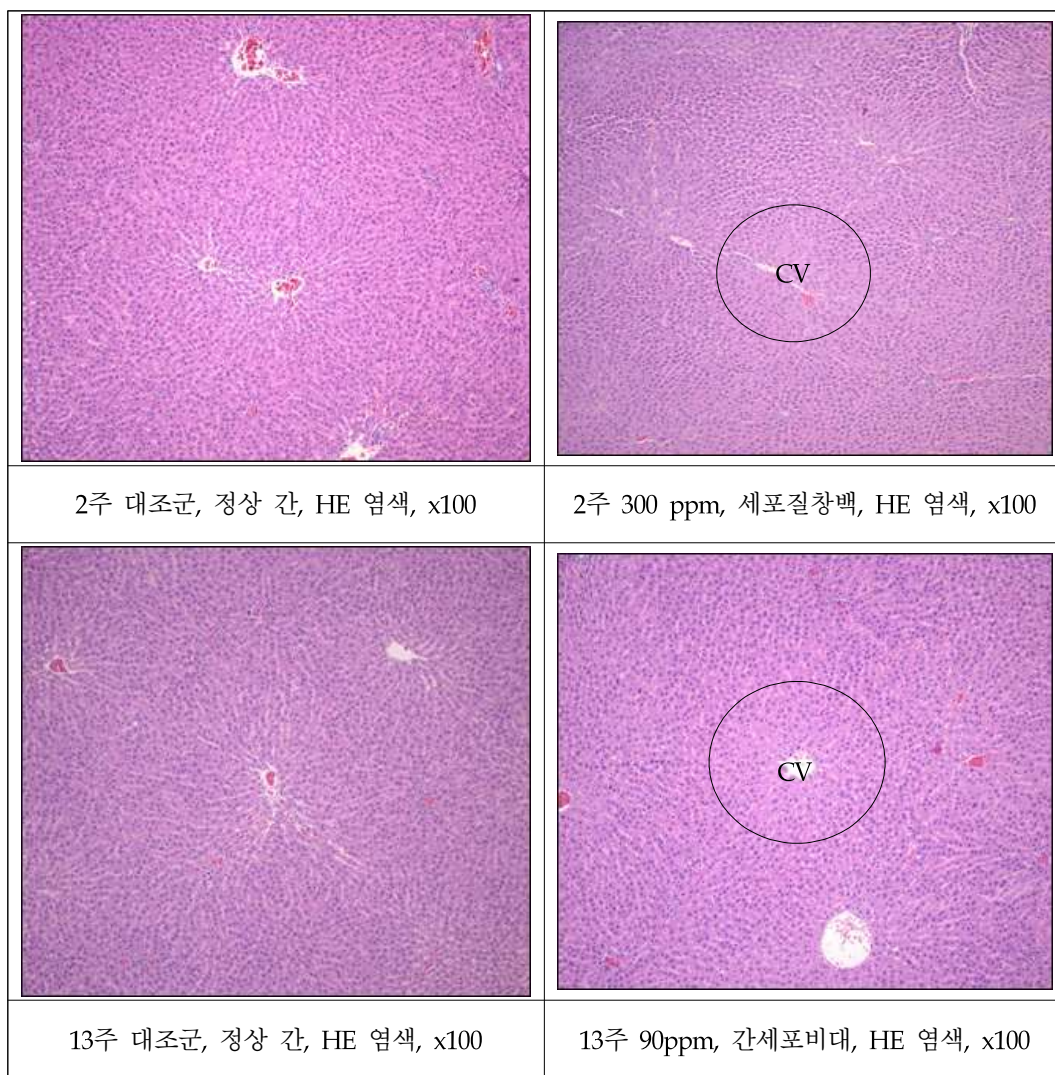
수컷 T3(90 ppm)에서 간의 소엽중심성 간세포 비대(hepatocellular hypertrophy, centrilobular), 암수 T3(90 ppm)에서 비강의 점액세포 과형성(hyperplasia, mucous cell), 단핵구의 침윤(Infiltration, mononuclear cell), 염증(inflammation), 이하선 및 악하선의 선방세포 비대(hypertrophy, acinar cell)이 관찰되었다. 조직병리학적 검사 결과는 표 2 및 그림1에서 그림4까지에 나타내었다.

<표 1> 2주 노출시험에서 관찰된 조직병리학적 변화

Histopathologic findings	Concentration (ppm)							
	0	30	100	300	0	30	100	300
<i>Liver</i>								
Pale cytoplasm, hepatocellular								
Minimal	0/5	0/5	0/5	2/5	0/5	0/5	0/5	2/3
Mild	0/5	0/5	0/5	2/5	0/5	0/5	0/5	2/3
Moderate	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	3/3
Pigmentation, Kupffer cells								
Minimal	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	2/3
Mild	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1/3
<i>Nasal Cavity</i>								
Hemorrhage, turbinate								
Minimal	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/3
Mild	0/5	0/5	0/5	3/5	0/5	0/5	0/5	3/3
Infiltration, mononuclear cell								
Minimal	0/5	0/5	0/5	2/5	0/5	0/5	0/5	0/3
Mild	0/5	0/5	1/5	2/5	0/5	0/5	0/5	0/3
Hyperplasia, transitional cell								
Minimal	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	2/3
Mild	0/5	0/5	0/5	4/5	0/5	0/5	0/5	0/3
Erosion/ulcer, transitional cells								
Mild	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/3
<i>Submandibular gland</i>								
Hypertrophy, acinar cell								
Minimal	0/5	2/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/3
Mild	0/5	0/5	4/5	0/5	0/5	0/5	3/5	0/3
Moderate	0/5	0/5	1/5	5/5	0/5	0/5	0/5	3/3

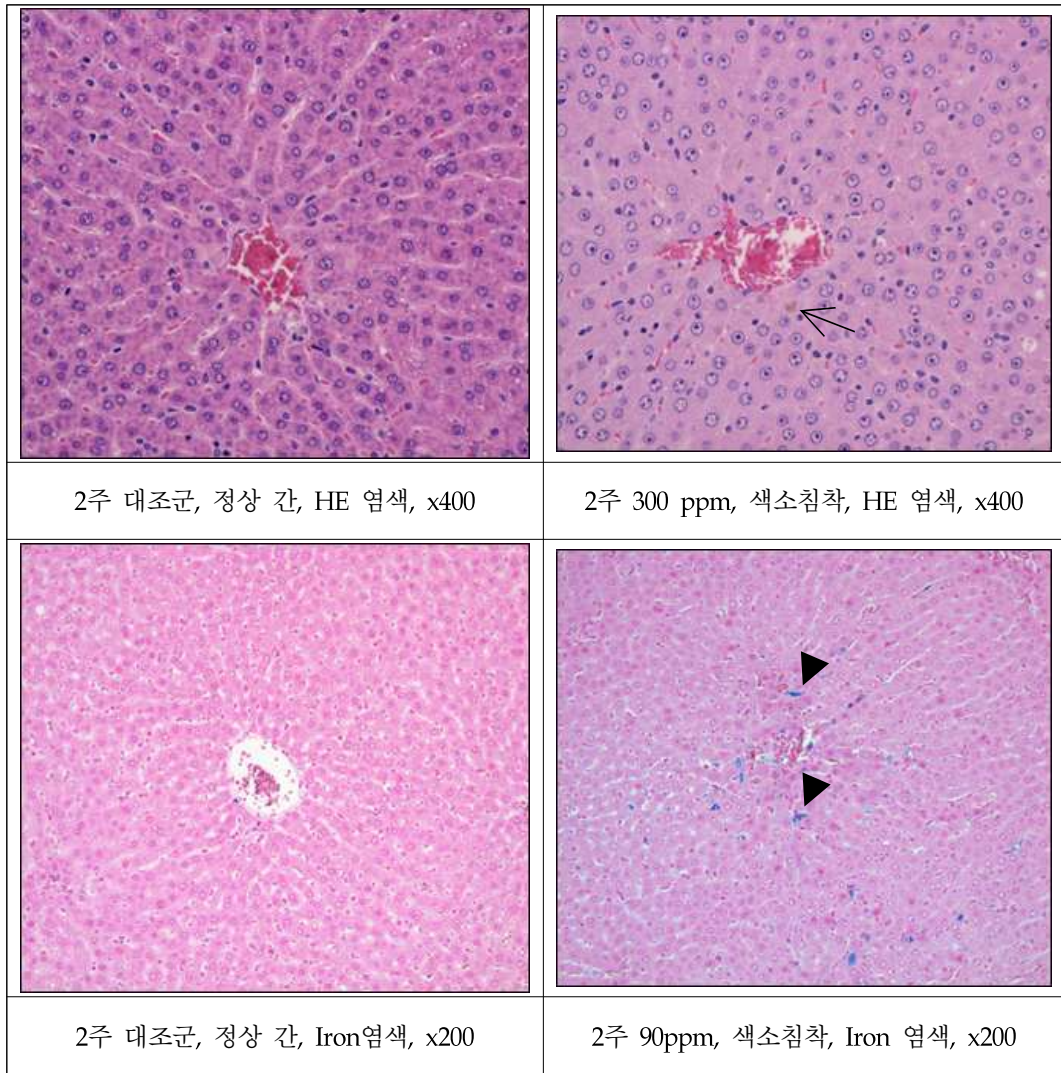
〈표 2〉 13주 노출시험에서 관찰된 조직병리학적 변화

Histopathologic findings	Concentration (ppm)							
	0	10	30	90	0	10	30	90
<i>Liver</i>								
Hepatocellular hypertrophy								
Minimal	0/10	0/10	0/10	4/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Mild	0/10	0/10	0/10	2/10	0/10	0/10	0/10	0/10
<i>Nasal Cavity</i>								
Inflammation								
Minimal	0/10	0/10	0/10	2/10	0/10	0/10	0/10	2/10
Mild	0/10	0/10	0/10	5/10	0/10	0/10	0/10	2/10
Infiltration, mononuclear cell								
Minimal	0/10	0/10	0/10	1/10	0/10	0/10	0/10	1/10
Mild	0/10	0/10	0/10	1/10	0/10	0/10	0/10	1/10
Moderate	0/10	0/10	0/10	1/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Hyperplasia, mucous cell								
Minimal	0/10	0/10	0/10	4/10	0/10	0/10	0/10	4/10
Mild	0/10	0/10	0/10	4/10	0/10	0/10	0/10	1/10
<i>Parotid gland</i>								
Hypertrophy, acinar cell								
Minimal	0/10	0/10	0/10	3/10	0/10	0/10	0/10	2/10
Mild	0/10	0/10	0/10	5/10	0/10	0/10	0/10	1/10
<i>Submandibular gland</i>								
Minimal	0/10	0/10	0/10	2/10	0/10	0/10	0/10	1/10



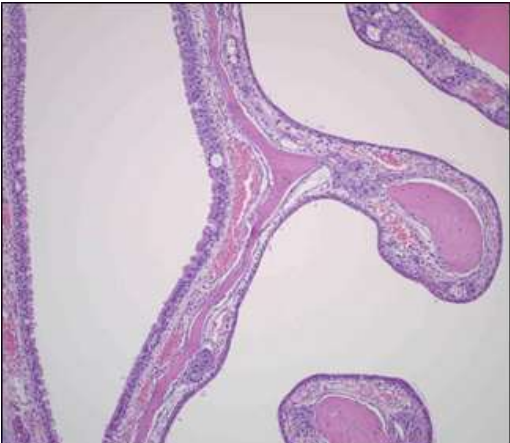
[그림1] 간의 조직병리학적 변화

2주 및 13주 노출 시험 모두에서 소엽중심성의 간세포 창백(2주, 원) 및 비대(13주, 원)가 관찰되었다. CV: central vein



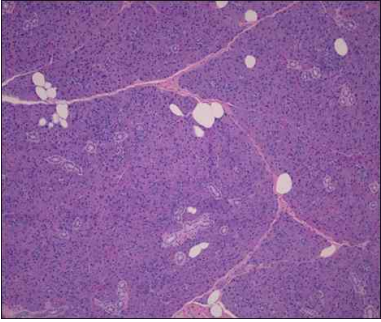
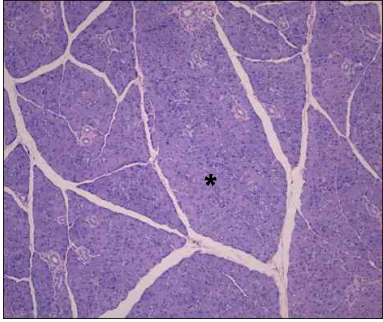
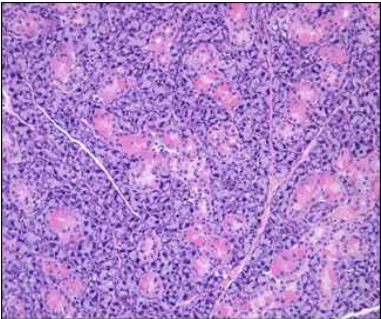
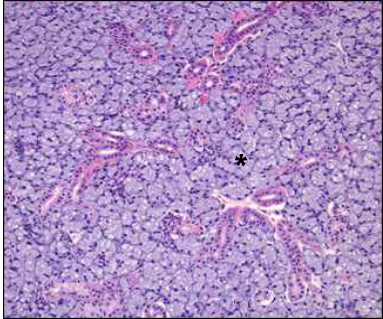
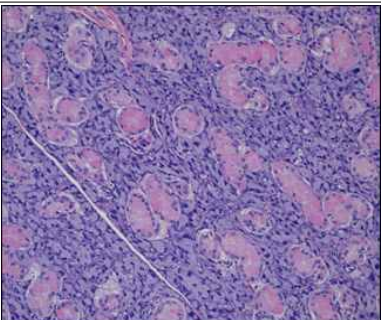
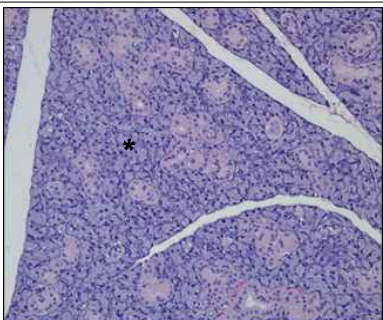
[그림2] 간의 조직병리학적 변화2

HE 염색 결과, 간의 동모양혈관에서 황갈색의 색소침착이 관찰되었다(화살표). Iron 염색시 황갈색 색소는 푸른색으로 반응하여 혈색소로 확인되었다(화살표 머리).

	
2주 대조군, 정상 비강, HE 염색, x100	2주 300 ppm, 출혈 및 이행상피 과형성, HE 염색, x100
	
13주 대조군, 정상 비강, HE 염색, x100	13주 90ppm, 염증, HE 염색, x100

[그림3] 비강의 조직병리학적 변화

2주 노출 시험에서 비강의 비갑개에서 출혈(별), 이행상피 과형성(화살표) 등이 관찰되었고, 13주 노출시험에서는 염증(화살표 머리)이 관찰되었다.

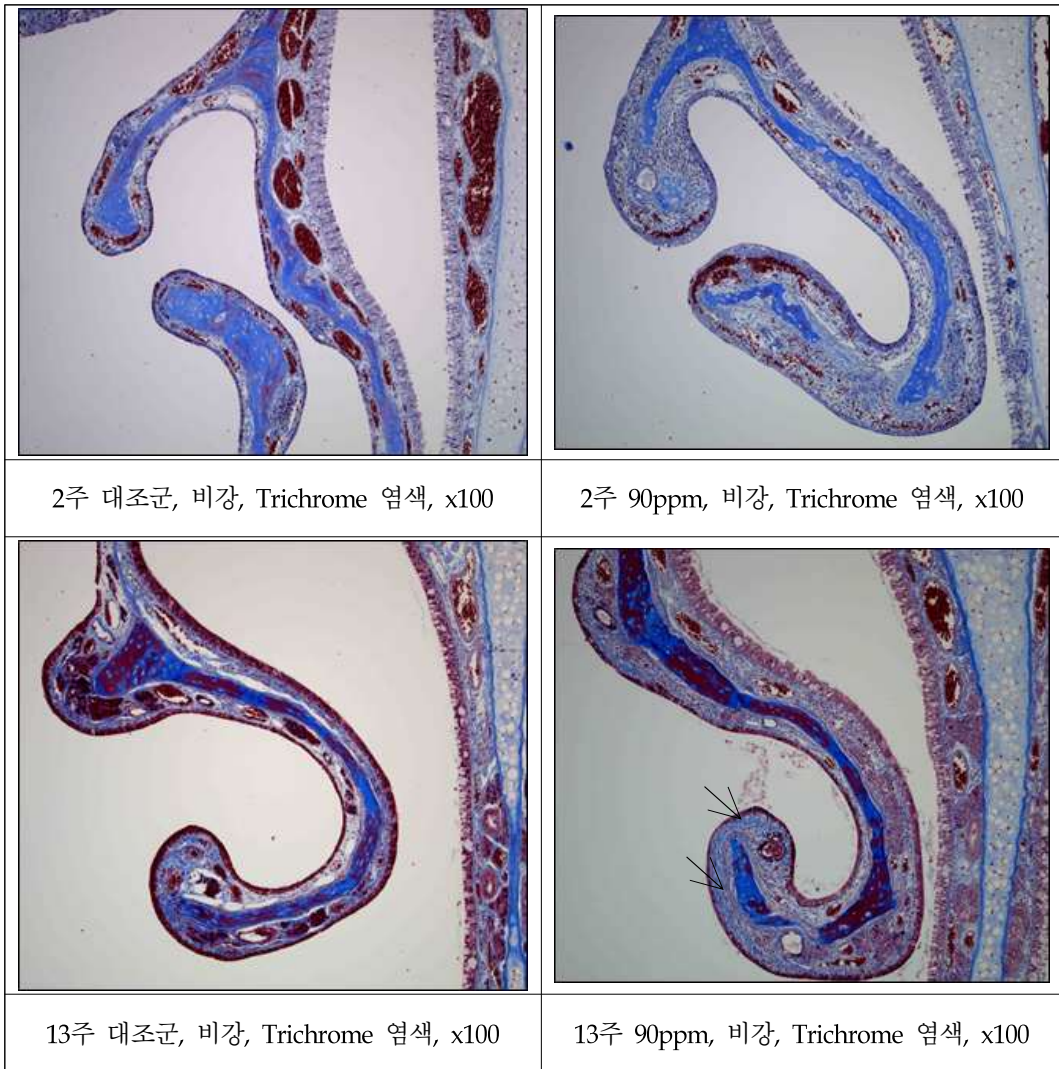
	
13주 대조군, 정상 이하선, HE 염색, x100	13주 90ppm, 이하선, 선방세포비대, HE 염색, x100
	
2주 대조군, 정상 간, HE 염색, x100	2주 300ppm, 악하선, 선방세포비대, HE 염색, x100
	
2주 대조군, 정상 간, HE 염색, x100	13주 90ppm, 악하선, 선방세포비대, HE 염색, x100

[그림4] 침샘의 조직병리학적 변화

2주 노출 시험에서는 악하선의 선방세포 비대(*)가 관찰되었고, 13주 시험에서는 이하선 및 악하선의 선방세포 비대(*)가 관찰되었다.

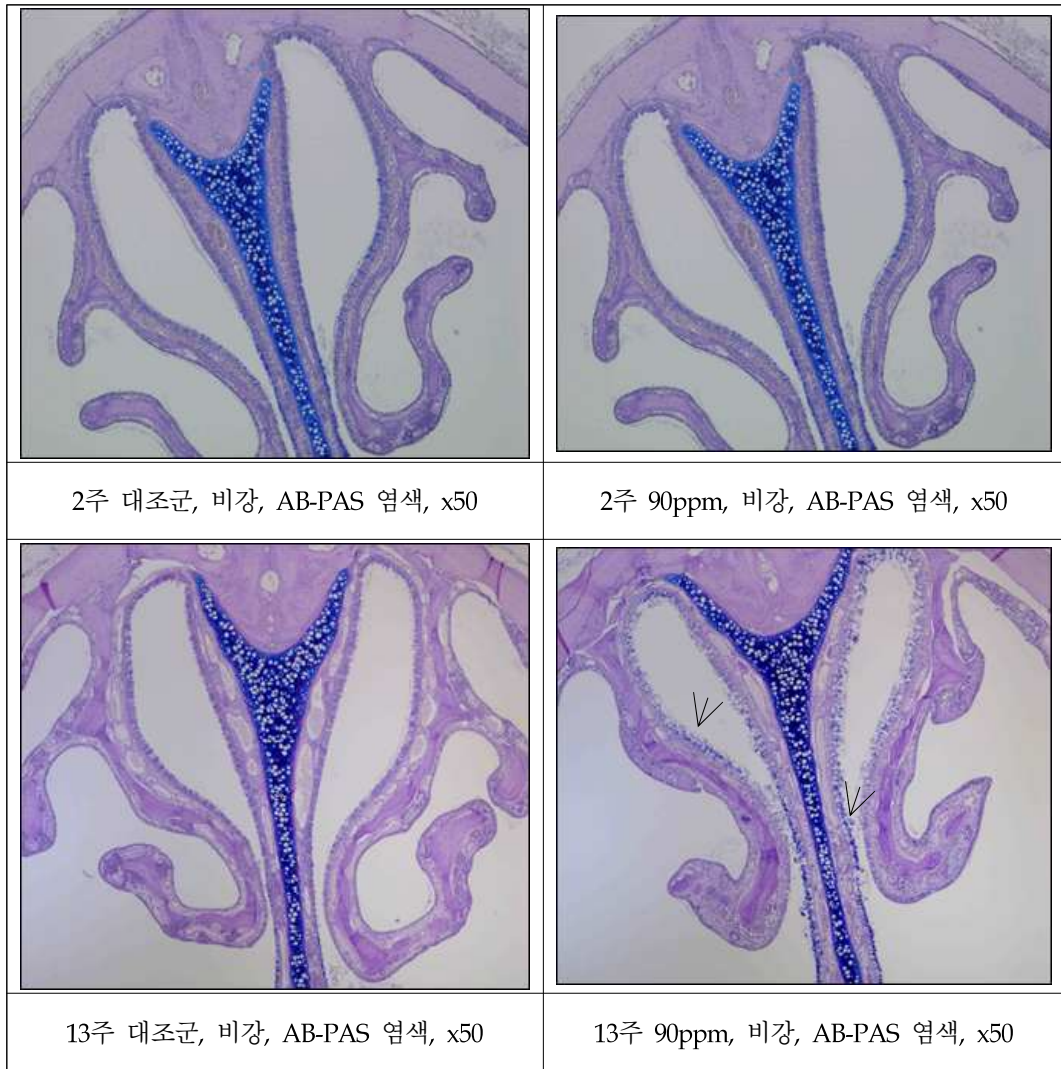
3. 특수염색

간에 대한 iron stain 결과, 조직병리학적 검사시 2주 노출시험의 90 ppm 노출군 암컷에서 관찰된 색소침착은 그림 2에서와 같이 푸른색의 양성반응을 보였다. 비강에 대한 trichrome 염색결과, 대조군과 비교시 2주에서는 콜라겐 섬유의 증식이 확인되지 않았으나, 13주에서는 고농도 노출군에서 콜라겐 섬유의 증식이 관찰되었다(그림 5). 비강에 대한 AB-PAS염색 결과, 13주 수컷 고농도군의 점액세포 증식이 확인되었다(그림 6). 침샘에 대한 AB-PAS결과, 대조군과 비교시 2주 및 13주 수컷 고농도군 모두에서 점액세포의 염색성은 차이가 없었다(그림 7~8). 자궁에 대한 AB-PAS 염색결과, 자궁 위축상태에서도 발정주기는 모두 관찰되었다(그림 9). 침샘에 대한 AB염색 결과, 대조군과 비교시 2주 및 13주 수컷 고농도군 모두에서 점액세포의 염색성은 차이가 없었으나, 악하선의 비대된 세포는 모두 Alcian blue에 반응하였다(그림 10~11). PAS염색 결과, 고환에서 대조군과 비교시 2주 및 13주 모두 형태적 차이는 확인할 수 없었다(그림 12).



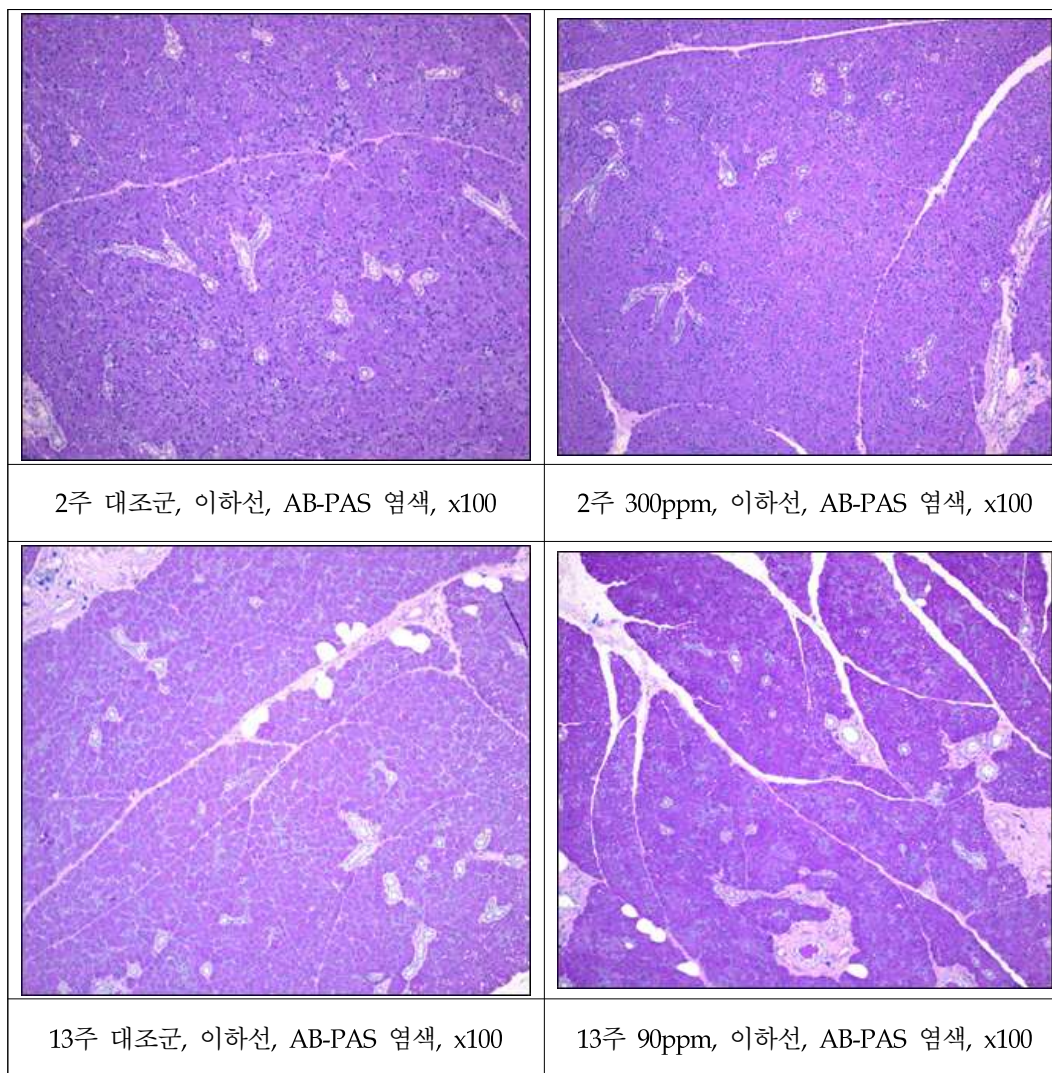
[그림 5] 비강의 trichrome 염색 결과

조군과 비교시 2주에서는 콜라겐 섬유증의 증식이 확인되지 않았으나, 13주에서는 고농도 노출군에서 콜라겐 섬유증의 증식이 관찰되었다(화살표).



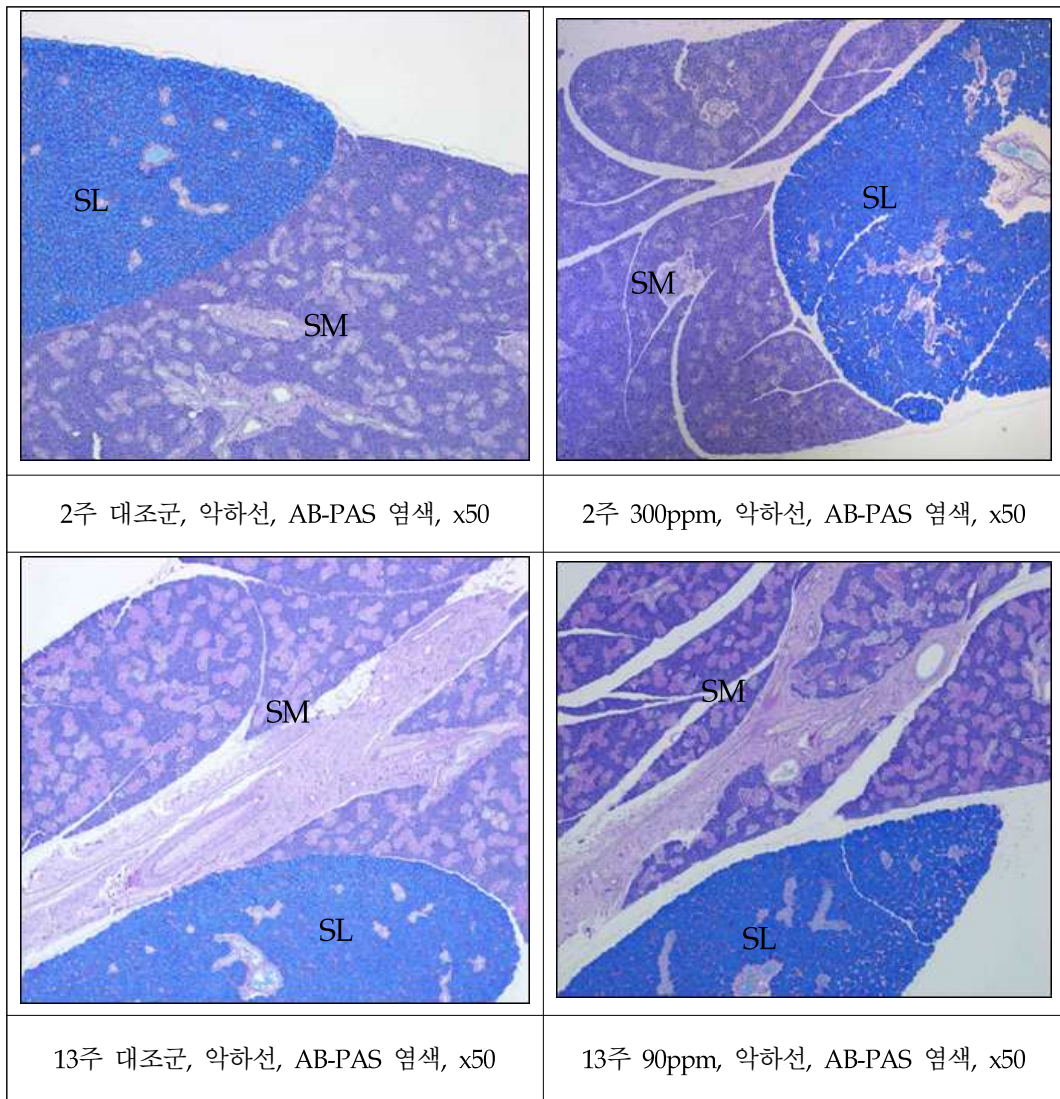
[그림 6] 비강의 AB-PAS 염색 결과

2주에서는 점액세포의 과형성이 확인되지 않았으나, 13주에서는 점액세포가 증가하였다(화살표).



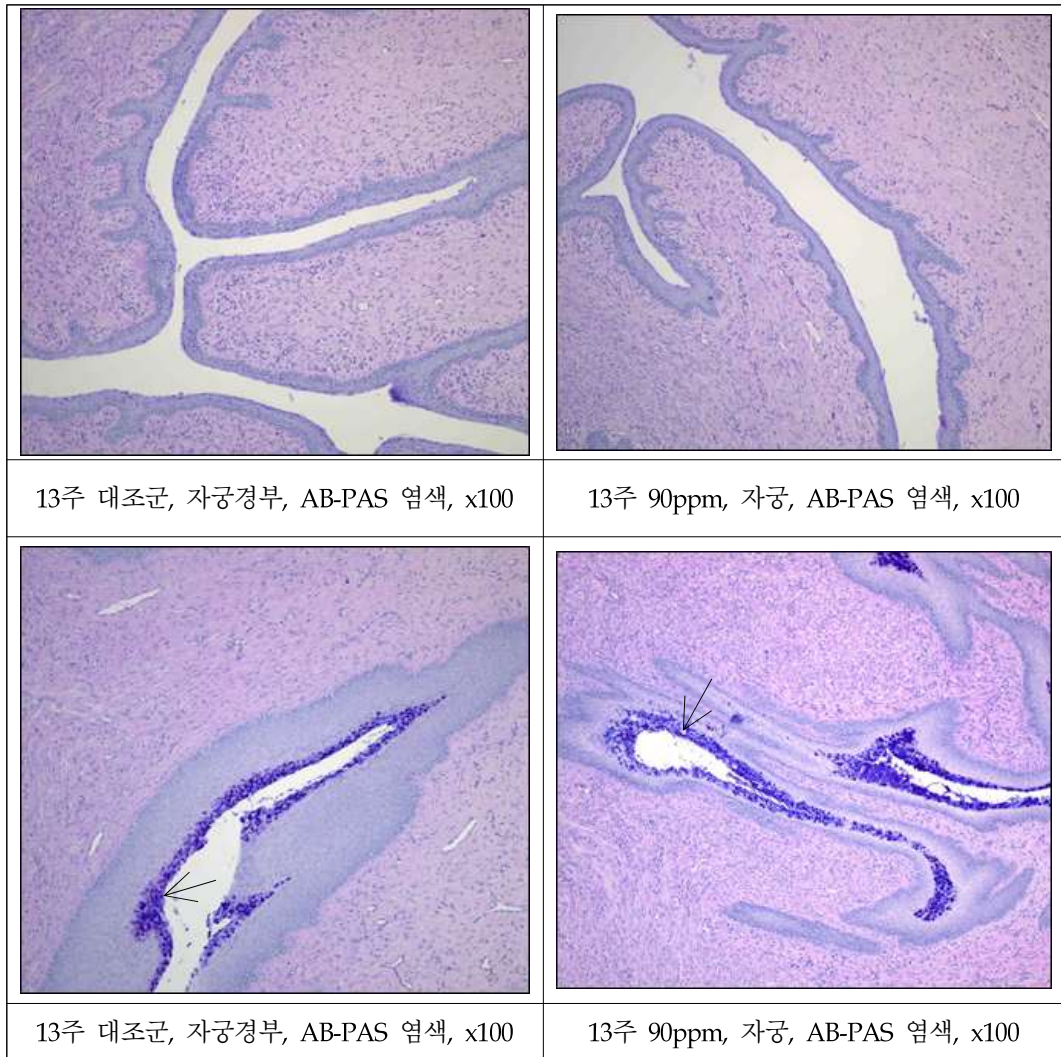
[그림 7] 침샘(이하선)의 AB-PAS 염색 결과

2주 및 13주 모두에서 이하선의 점액의 염색성은 대조군과 비교시 변화가 관찰되지 않았다.



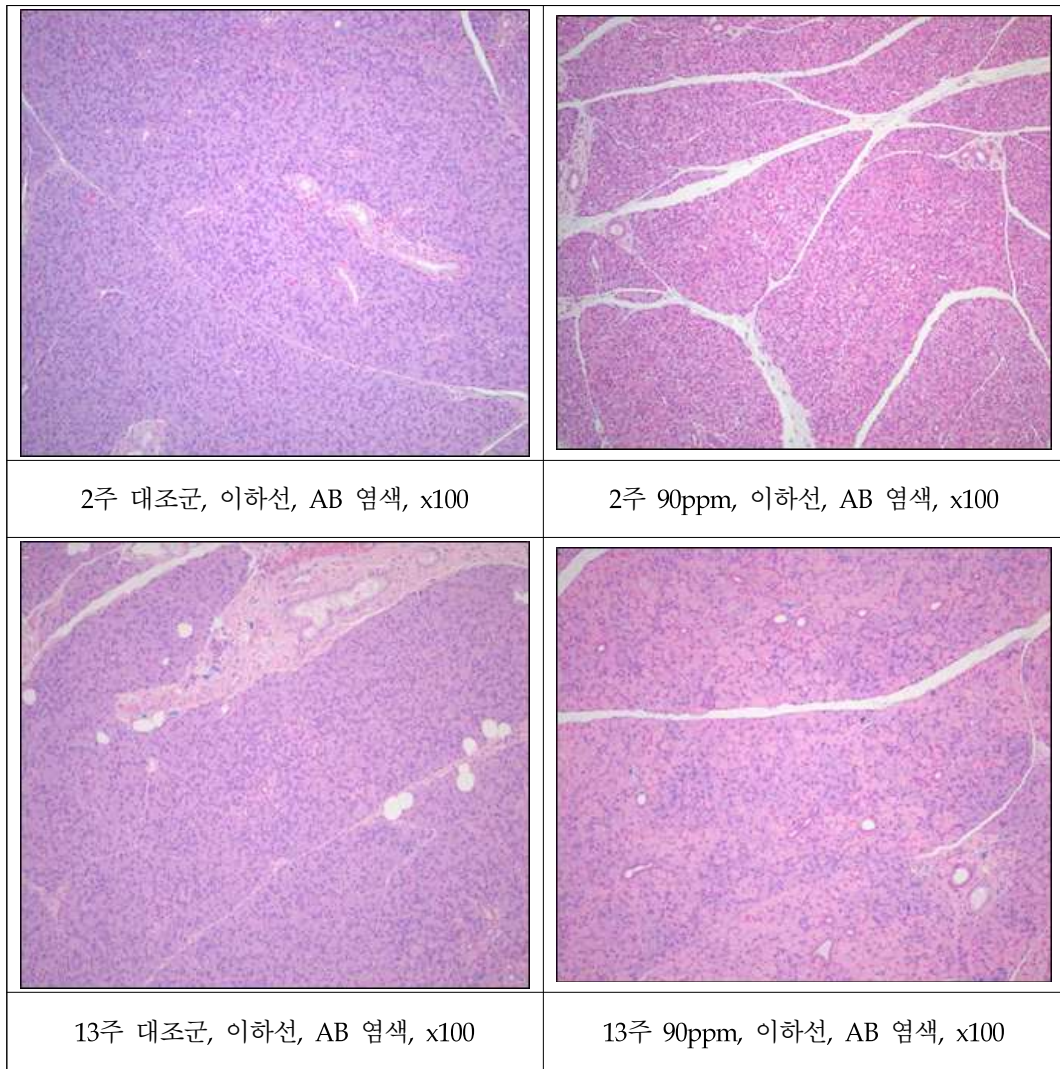
[그림 8] 침샘(악하선)의 AB-PAS 염색 결과

2주 및 13주 모두에서 악하선의 점액의 염색성은 대조군과 비교 시 변화가 관찰되지 않았다. SM: submandibular gland, 악하선; SL: sublingual gland, 설하선



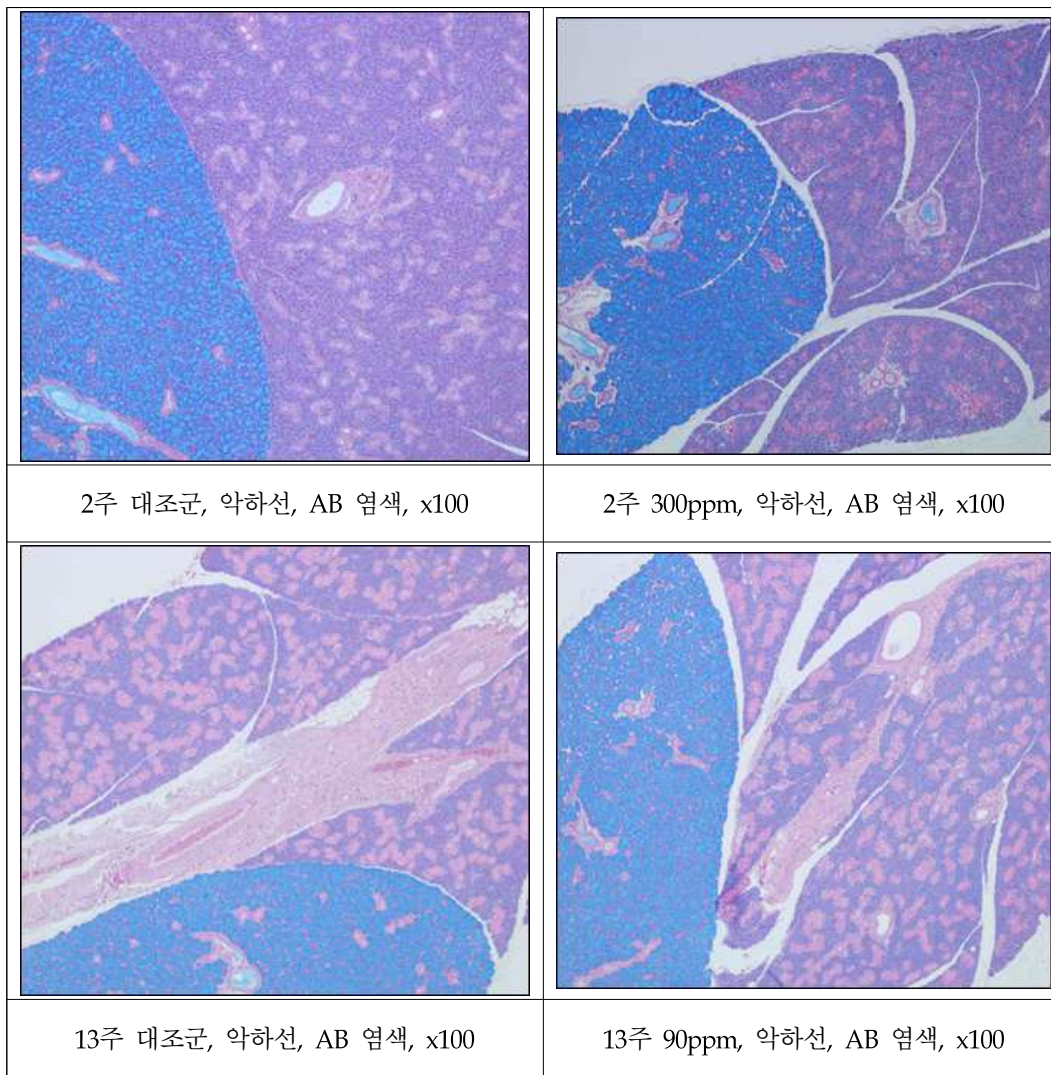
[그림 9] 자궁의 AB-PAS 염색 결과

대조군과 비교시 발정 주기에 따른 점액 분비(화살표)의 이상은 관찰되지 않았다.



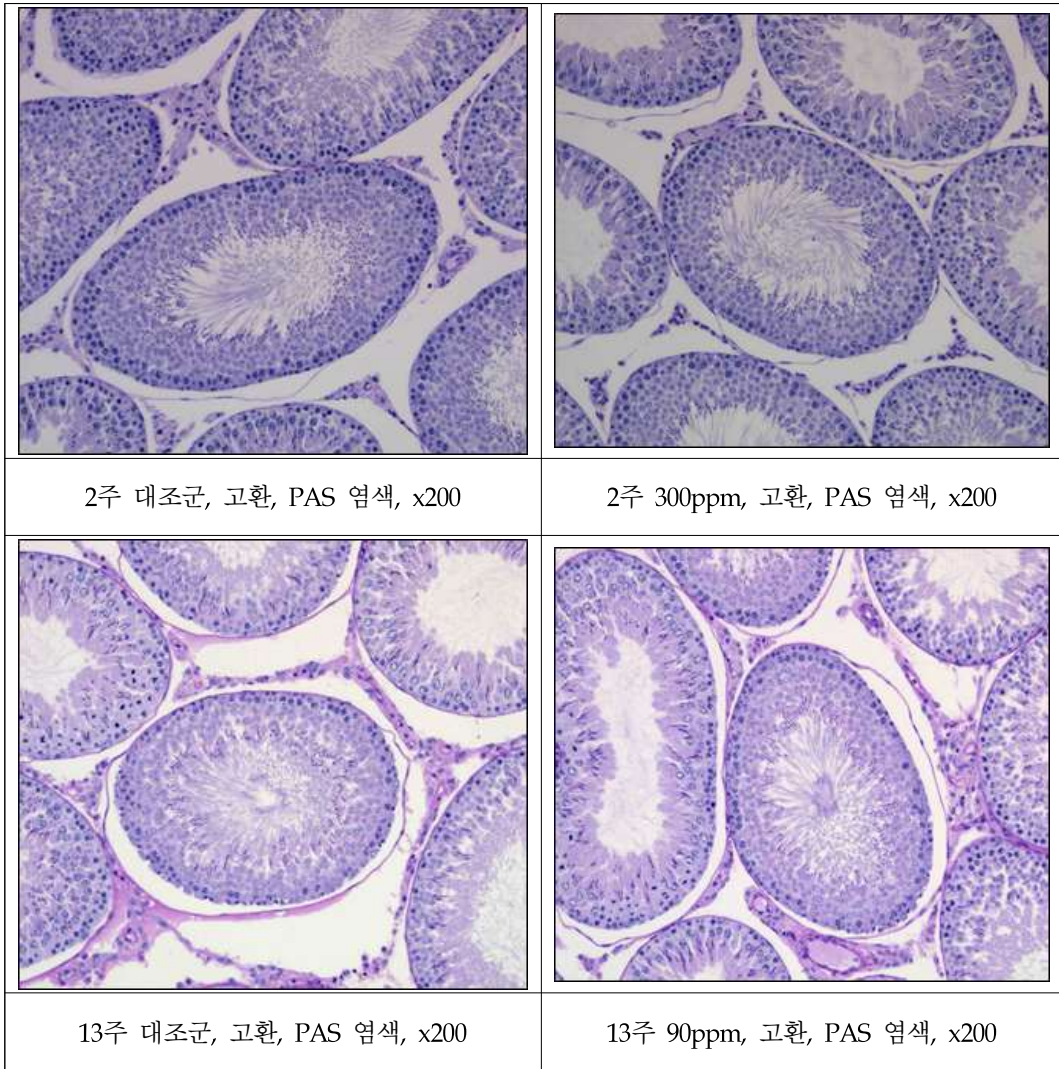
[그림 10] 침샘(이하선)의 AB 염색 결과

2주 및 13주 노출 시험 모두에서 이하선의 분비 점액의 염색성은 대조군과 비교시 차이가 없었다.



[그림 11] 침샘(악하선)의 AB 염색 결과

2주 및 13주 노출 시험 모두에서 악하선의 분비 점액의 염색성은 대조군과 비교시 차이가 없었다.



[그림 12] 고환의 PAS 염색 결과

7단계 정세관의 생식세포 이외에는 2주 및 13주 노출 시험 모두에서 대조군과의 차이는 확인할 수 없었다.

4. 면역조직화학 분석

조직내 양성발현 정도를 대조군과 비교하였다. 그 결과, 2주 및 13주 시험에서 간의 cytochrome(cyt) P450 2E1, 비강의 caspase-3의 양성 반응 발현이 증가 경향을 보였다(표3, 4; 그림 13~20).

<표 3> 2주 시험의 양성반응 발현 정도

항원	장기	대조군	300 ppm
cytP450 2E1	간	2.00±0.00	3.00±0.00*
cytP450 2E1	비강	0.00±0.00	0.00±0.00
PCNA	침샘(악하선)	1.67±0.58	1.33±0.58
PCNA	침샘(이하선)	0.00±0.00	0.00±0.00
Caspase-3	간	0.00±0.00	0.00±0.00
Caspase-3	비강	0.00±0.00	0.00±0.00
Caspase-3	침샘(이하선)	0.00±0.00	0.00±0.00

각 값은 각 군의 평균 점수를 나타내었다.

0: 반응 없음, 1: 약한 반응, 2: 중간 정도의 반응, 3: 심한 정도의 반응

대조군 대비 NMF노출군의 값을 통계적으로 분석하여 그 결과를 나타내었다.

*: $P < 0.05$

<표 4> 13주 시험의 양성반응 발현 정도

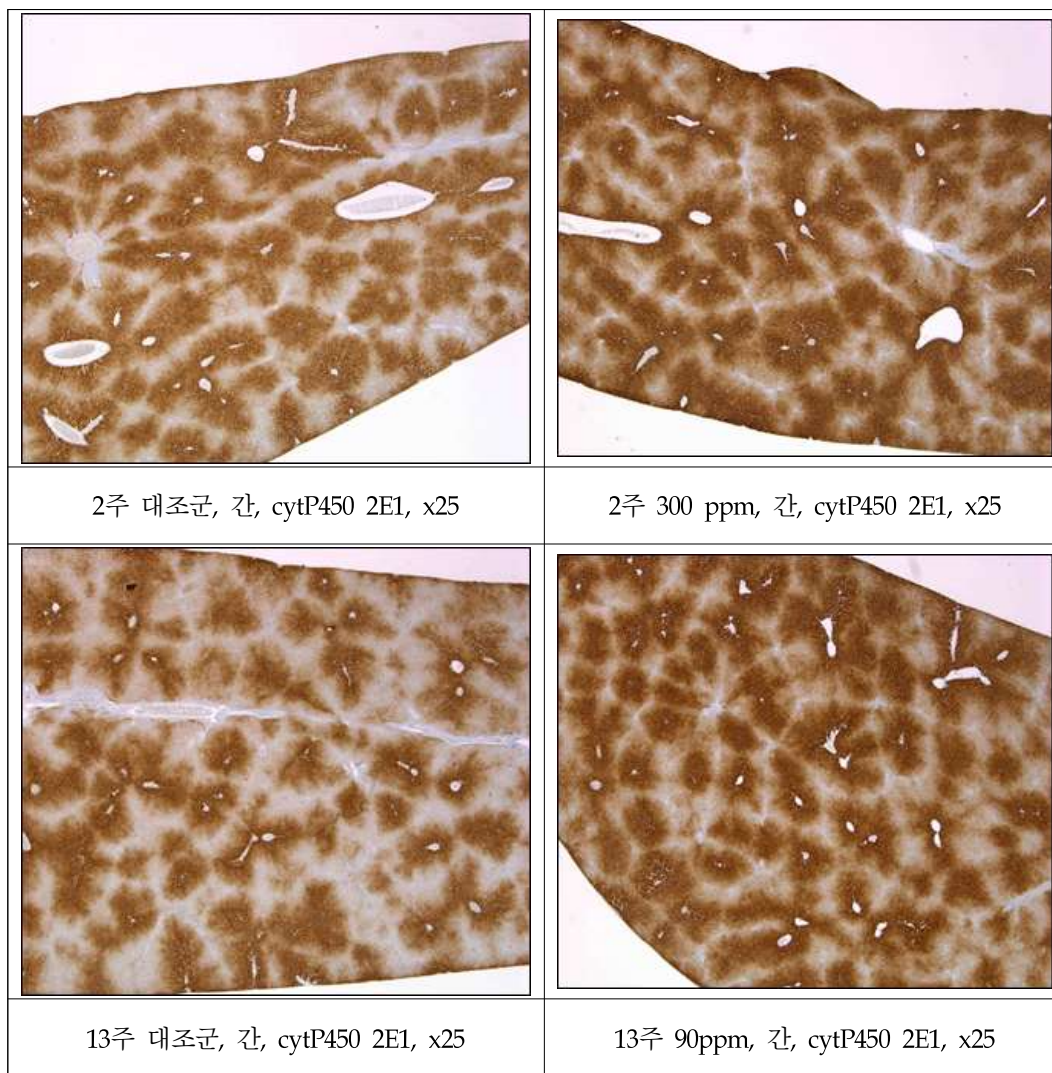
항원	장기	대조군	300 ppm
cytP450 2E1	간	1.80±0.45	2.06±0.55*
cytP450 2E1	비강	0.00±0.00	0.00±0.00
PCNA	침샘(악하선)	1.60±0.55	1.60±0.55
PCNA	침샘(이하선)	0.00±0.00	0.00±0.00
Caspase-3	간	0.00±0.00	0.00±0.00
Caspase-3	비강	0.00±0.00	1.00±0.00**
Caspase-3	침샘(이하선)	0.00±0.00	0.00±0.00

각 값은 각 군의 평균 점수를 나타내었다.

0: 반응 없음, 1: 약한 반응, 2: 중간 정도의 반응, 3: 심한 정도의 반응

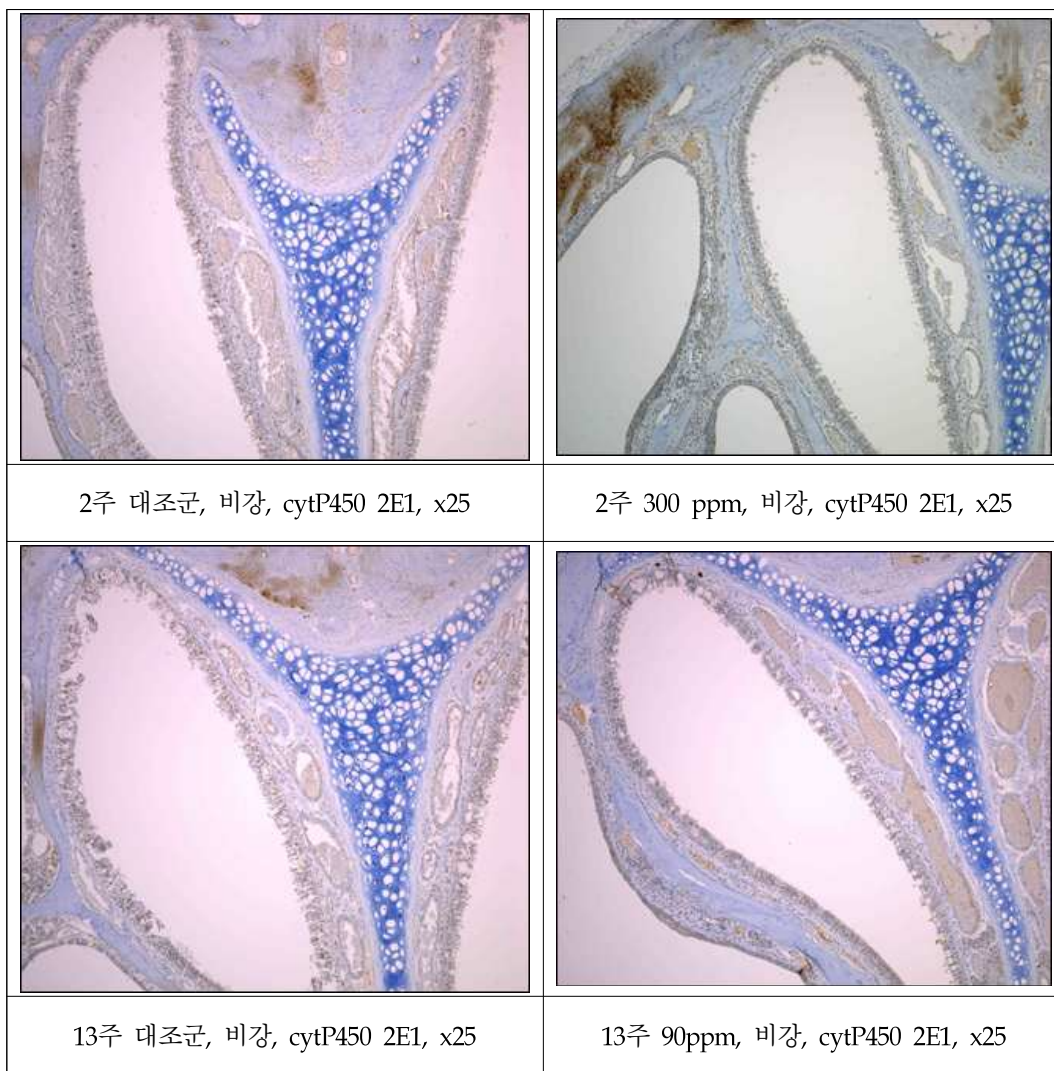
대조군 대비 NMF노출군의 값을 통계적으로 분석하여 그 결과를 나타내었다.

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$

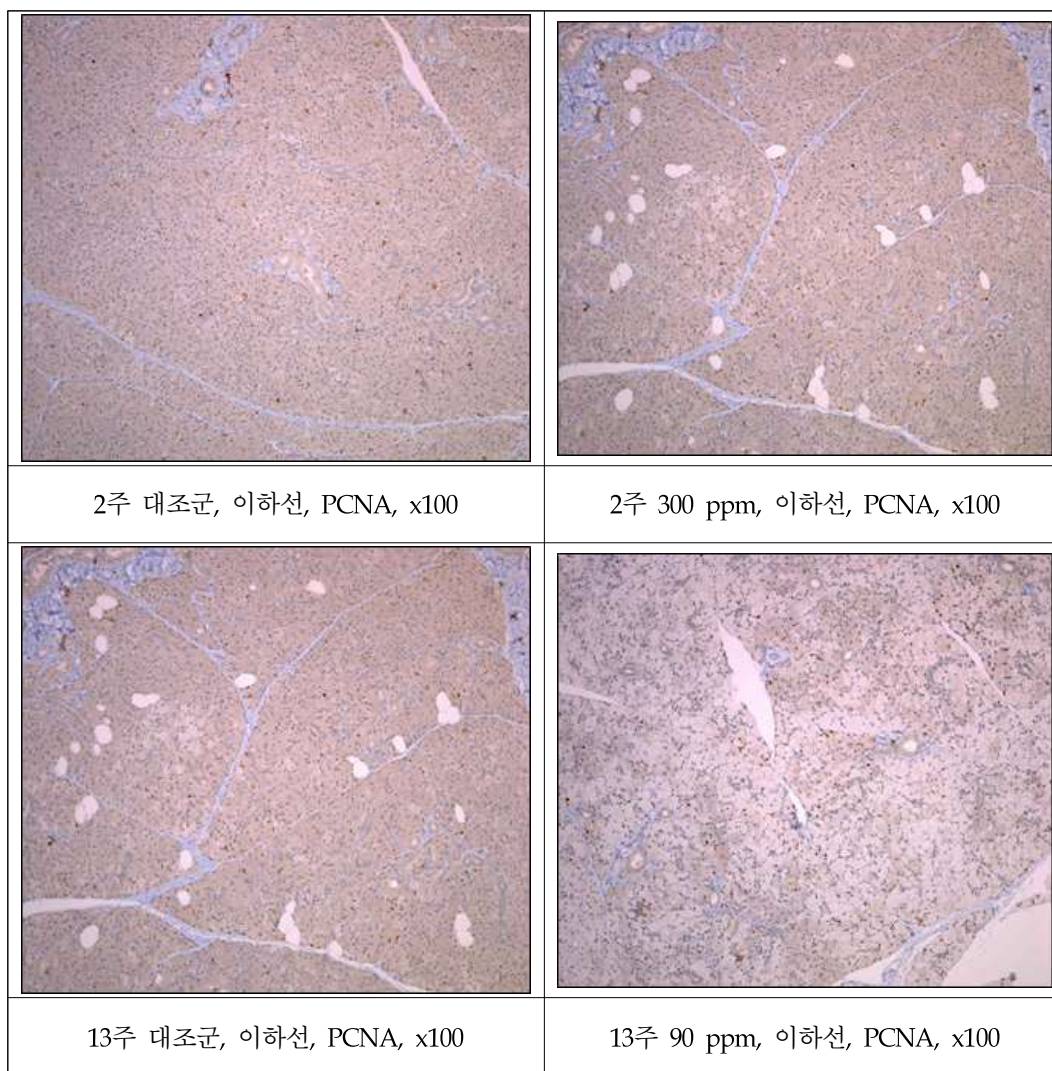


[그림 13] 면역조직화학검사 결과: 간 cytP450 2E1

2주 및 13주 노출 시험 모두에서 대조군과 비교시 갈색 양성반응이 더 넓은 범위에서 짙게 관찰되었다.

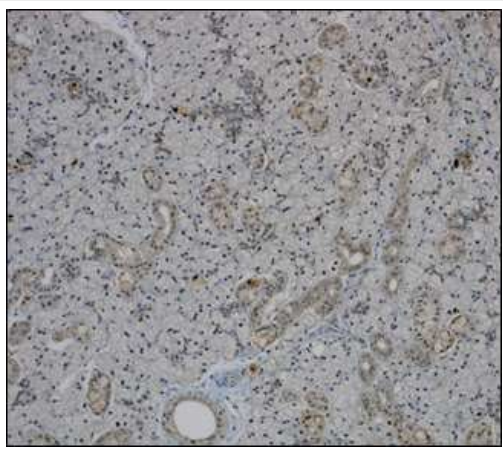
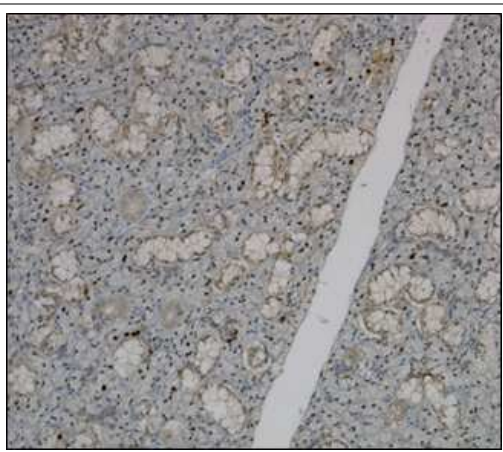


[그림 14] 면역조직화학검사 결과: 비강 cytP450 2E1
2주 및 13주 노출 시험 모두에서 양성반응은 관찰되지 않았다.



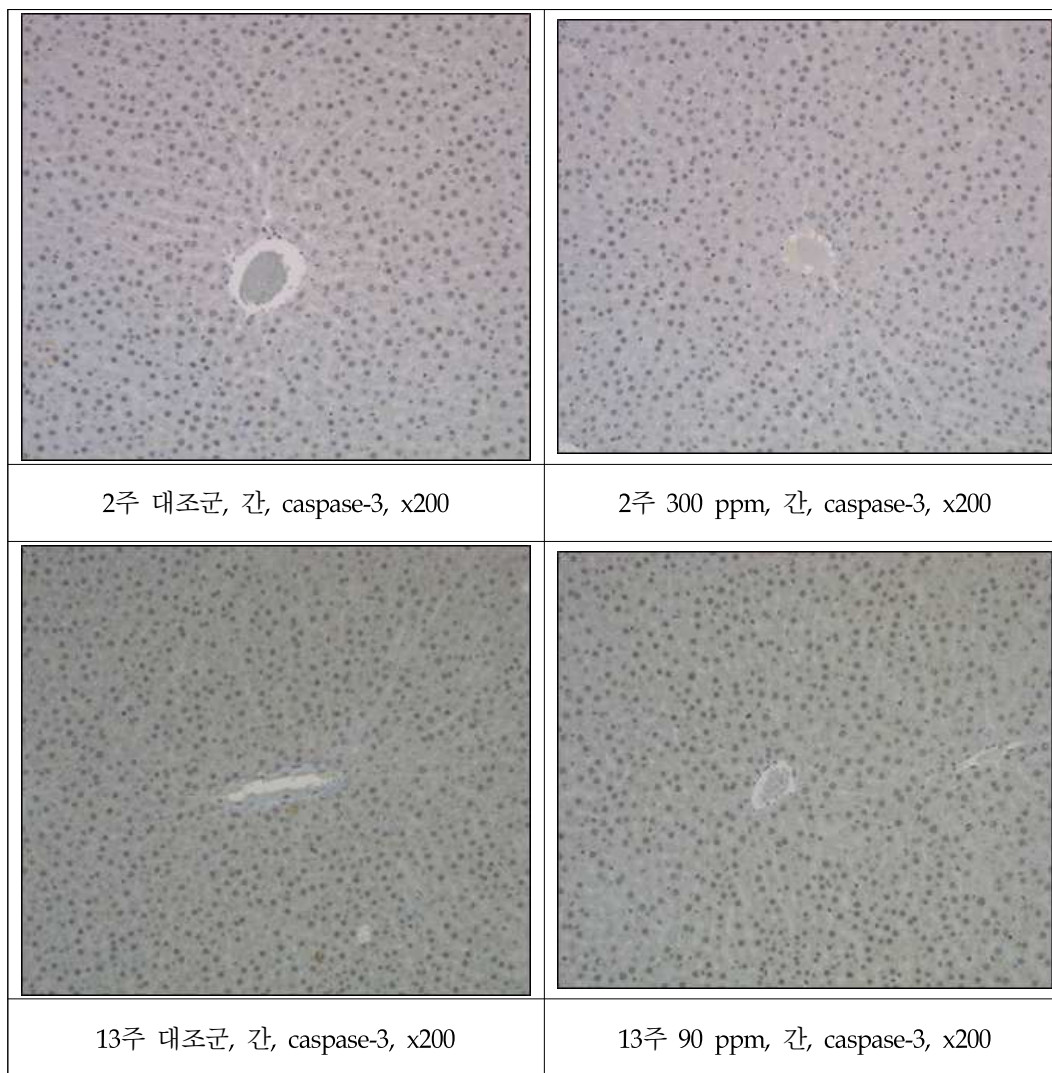
[그림 15] 면역조직화학검사 결과: 이하선 PCNA

2주 및 13주 노출 시험 모두에서 대조군과의 차이는 관찰되지 않았다.

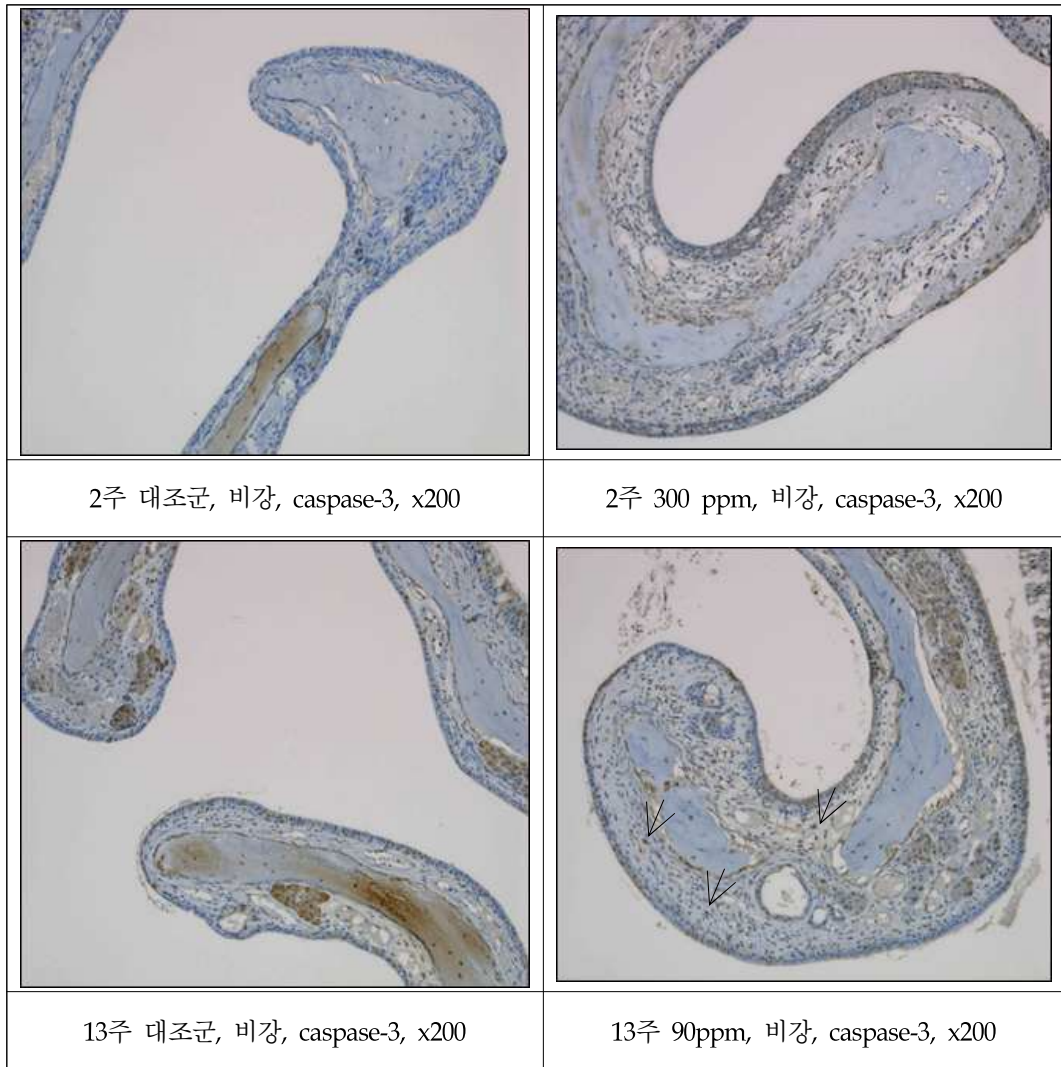
	
2주 대조군, 악하선, PCNA, x200	2주 300 ppm, 악하선, PCNA, x200
	
13주 대조군, 악하선, PCNA, x200	13주 90 ppm, 악하선, PCNA, x200

[그림 16] 면역조직화학검사 결과: 악하선 PCNA

2주 및 13주 노출 시험 모두에서 대조군과의 차이는 관찰되지 않았다.

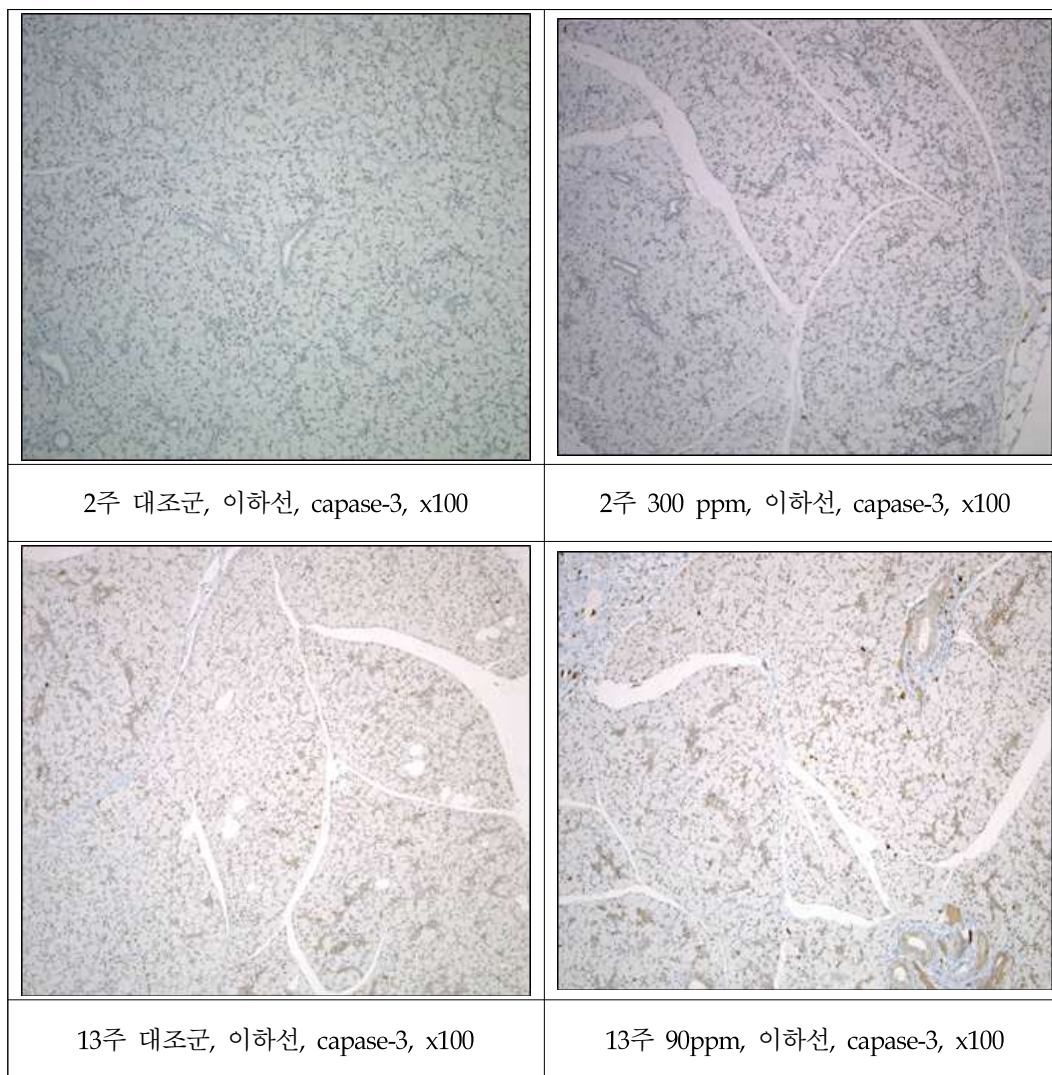


[그림 17] 면역조직화학검사 결과: 간 caspase-3
2주 및 13주 노출 시험 모두에서 양성반응은 관찰되지 않았다.



[그림 18] 면역조직화학검사 결과: 비강 caspase-3

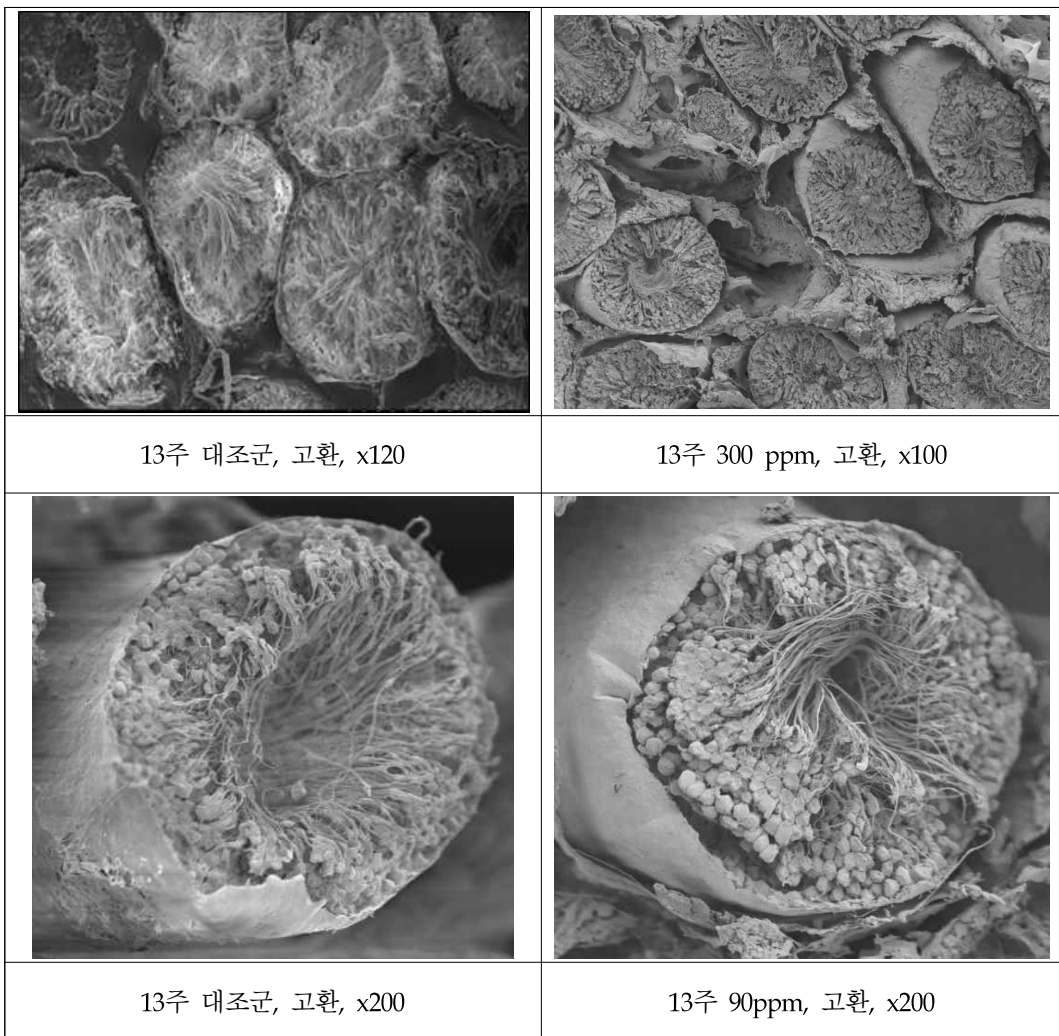
13주 노출 시험에서 갈색의 양성반응(화살표)이 약한 정도로 관찰되었다.



[그림 19] 면역조직화학검사 결과: 이하선 caspase-3
2주 및 13주 노출 시험 모두에서 대조군과의 차이는 확인되지 않았다.

5. 주사전자현미경 분석

주사전자현미경을 이용한 고환의 구조 확인 결과, 대조군대비 차이는 없었다 (그림 20).

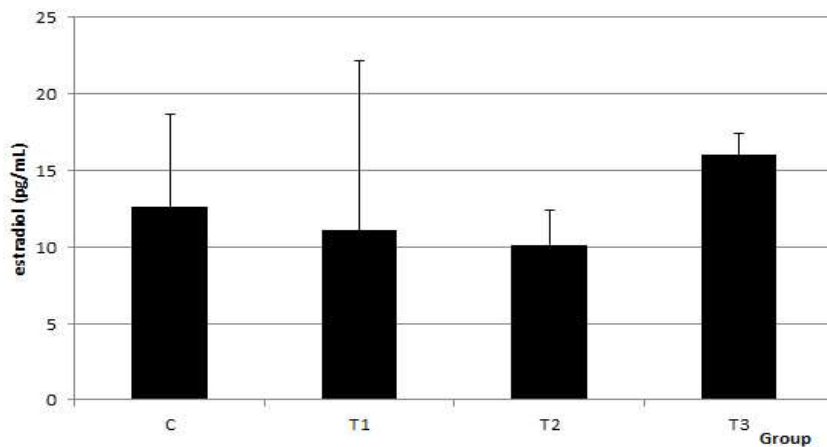


[그림20] 주사전자현미경 분석

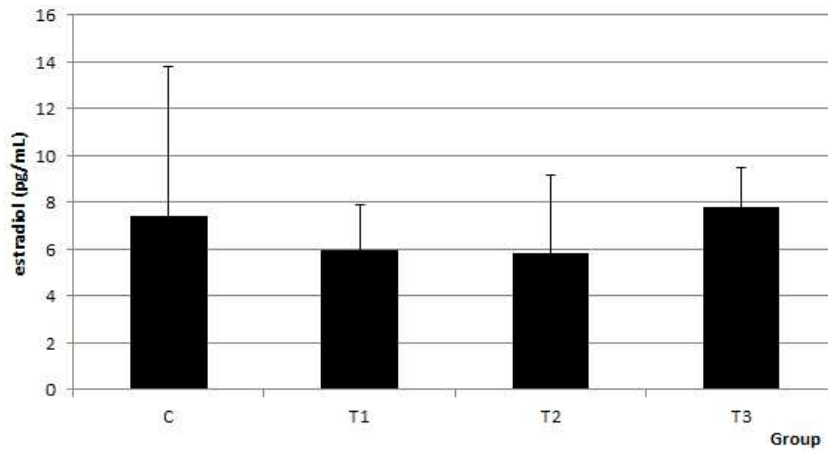
고환에서 대조군과 비교시 차이를 확인할 수 없었다.

6. ELISA 결과

2주 및 13주 노출 시험의 암컷 혈중 estradiol 농도 측정 결과, 대조군대비 차이는 관찰되지 않았다. 그 값은 <그림 21~22>에 나타내었다.



<그림 21> 2주 노출 시험의 암컷 혈중 estradiol 농도
 각 군에 대한 평균값과 표준편차에 대해 표시하였다. 2주 노출 시험의 모든 노출군에서는 대조군과 비교시 혈중 estradiol의 농도의 차이가 관찰되지 않았다.
 C: control, T1: 30 ppm, T2: 100 ppm, T3: 300 ppm



<그림 22> 13주 노출 시험의 암컷 혈중 estradiol 농도

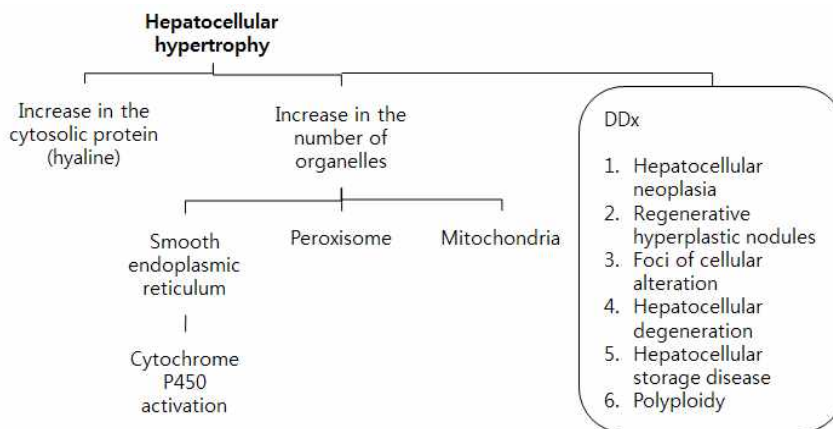
각 군에 대한 평균값과 표준편차에 대해 표시하였다. 13주 노출 시험의 모든 노출군에서는 대조군과 비교시 혈중 estradiol의 농도의 차이가 관찰되지 않았다. C: control, T1: 10 ppm, T2: 30 ppm, T3: 90 ppm

IV. 고찰

산업계 전반에 걸친 다양한 사용처와 연간 17,000톤 정도의 많은 사용량에도 불구하고, NMF는 산업독성분야에서 DMF의 노출 생체지표 정도로만 인식되어져 왔다. 이에 NMF의 2주 및 13주 노출 흡입 독성 시험을 실시한 결과, 간, 비강, 침샘, 고환, 자궁 등에서 조직병리학적인 변화가 관찰되었다. 이에, 본 연구에서는 조직병리학적 변화가 관찰된 장기·조직에서 형태적인 특징을 분석하여 기존 연구를 위한 기초 정보 및 추가적인 독성 정보를 제공하고자 하였다.

간은 조직병리학적 검사 결과, 2주 노출 시험에서 창백한 세포질 및 황갈색의 색소침착, 13주 노출 시험에서 간세포 비대가 소엽중심성으로 관찰되었다. 소엽중심성의 간세포 비대는 세포핵 단백질 증가나 활면소포체, 퍼옥시좀, 미토콘드리아 등 세포소기관증가 등에 의해 유발된다 (그림 23). 이 중 활면소포체의 증가는 주로 cytP450 활성화에 의해 유도되어진다(Thoolen et al., 2010). 이중 세포핵 단백질, 퍼옥시좀, 미토콘드리아 등에 의한 비대는 호산성의 염색성을 보이는데, 세포핵 단백질 중 대표적으로는 호산성의 구형으로 관찰되는 hyaline 이 있다. 퍼옥시좀의 증가에 의한 비대는 세포질내에 미세한 호산성 과립이 관찰되며, 미토콘드리아에 의한 비대는 세포질내에 호산성의 덩어리가 관찰된다 (Cattley et al, 2013; Thoolen et al., 2010). 본 연구에서 NMF 노출시 관찰된 조직병리학적 변화는 세포질이 창백하며 간세포의 크기가 증가하였다. 이에 창백한 세포질과 간세포 비대의 원인을 확인하기 위하여 cytP450 효소 발현을 확인하였으며, cytP450 아형 중에서도 간에서 외인성 물질이 유입될 때 유도되는 것으로 알려진 cytP450 2E1에 대한 발현 정도를 분석하였다. 그 결과, 2주 및 13주 노출 시험 모두에서 대조군과 비교시 cytP450 2E1의 발현이 증가하였는데, 이는 간 세포의 창백/비대 병변은 cytP450의 발현에 기인함을 의미한다. 간

비대가 관찰될 때는 변성이나 단일 세포 괴사 등이 동반될 수도 있어, caspase-3로 단일세포 괴사(single cell necrosis; 세포자살, apoptosis)을 확인하였다. 그 결과, caspase-3는 음성으로 나타나, 간 세포 비대에 따른 추가적인 독성 변화는 야기되지 않았음을 확인하였다. 또한 2주 노출 시험의 간에서는 소엽중심성으로 쿠퍼세포에서 황갈색의 색소침착이 관찰되어, iron 염색을 실시하였다. 간에서 관찰되는 황갈색의 색소는 리포푸신, 헤모시더린, 포피린 등이 있다. 리포푸신 및 포피린은 주로 담관이나 담세관주위에서 관찰되나(Thoolen et al., 2010), 본 연구의 병변은 소엽중심성으로 관찰되었다. 이에 iron 염색을 실시하였으며, 양성으로서 그 정도는 대조군과 비교 시 증가하였다. 헤모시더린은 주로 적혈구파괴(용혈)의 결과로서 생성되나(Patrick and Mann, 2013; Hall, 2013), 과량의 철이 간에 축적되어 관찰되기도 한다(Thoolen et al., 2010). 간에서 관찰된 변화가 어떤 원인에 기인하는지에 대해서는 추가적인 연구가 필요하다.



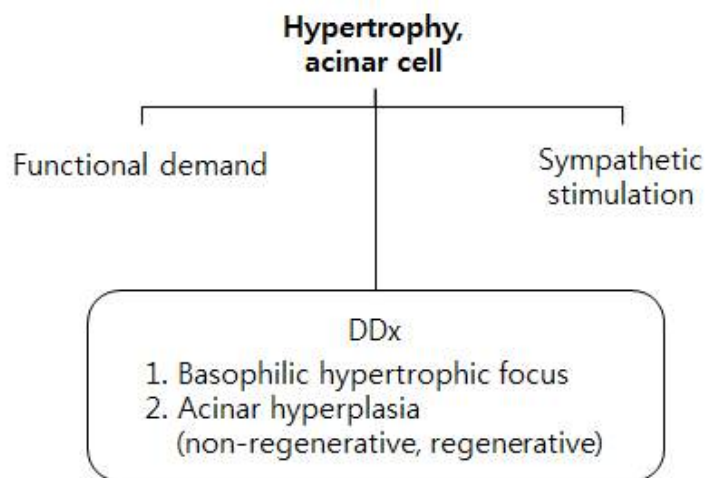
<그림 23> 간 세포 비대의 원인 및 감별진단 모식도

비강은 조직병리학적 검사 결과, 2주 노출 시험에서 출혈, 단핵세포의 침윤,

이행상피의 과형성, 이행상피의 미란/궤양, 13주 노출 시험에서 염증, 단핵세포 침윤, 점액세포의 과형성이 관찰되었다. 고유판의 출혈, 이행상피 과형성 등의 비강의 형태적인 특징을 고려할 때, 직접적인 자극에 기인한 변화가 아닐 가능성이 제기되었다. CytP450은 산소(O_2)의 전자를 1개 환원(reduction)시킴으로서 산화스트레스를 유발하는 활성산소(O_2^-)의 생성을 촉진하는 것으로 알려져 있다(Fang et al., 2002). 이에, 간에서의 변화가 cytP450에 의해 발현되므로 비강의 변화도 동일한 기전에 의한 변화인지 여부를 확인하고자 2주 및 13주 노출 시험의 비강에서 cytP450 2E1 염색을 실시하였다. 그 결과, 비강 상피에서 cytP450 2E1의 발현은 확인되지 않아, 비강에서의 변화는 cytP450 2E1과는 관련이 없는 것으로 판단하였다. 또한 caspase-3의 발현으로 세포자살의 여부를 확인하였는데, 이는 2주 노출 시험에서는 발현이 되지 않았고, 13주 노출 시험에서만 발현이 관찰되었다. 2주 시험과 13주 시험의 이러한 차이는 노출농도와 노출기간의 차이에 기인한 것으로 생각되며, 세포자살이 병변의 원인이 아닌 병변의 진행과정 중에 발생한 결과물인 것으로 판단된다. Trichrome염색결과, 2주 노출 시험에서는 콜라겐의 명확한 증식은 확인되지 않았으나, 13주 노출 시험에서는 경미한 콜라겐의 염색성 증가가 확인되었다. 이 결과에서, 13주 노출 시험에서는 손상과 동시에 회복 또한 진행되고 있음을 확인하였다. 13주 노출 시험의 비강에서 관찰된 점액세포의 과형성은 AB-PAS 양성반응으로 그 병변을 확진하였다.

침샘은 조직병리학적 검사 결과, 2주 노출 시험에서 악하선의 선방세포 비대, 13주 노출 시험에서 이하선 및 악하선의 선방세포 비대가 관찰되었다. 형태적으로 악하선의 병변은 선방세포의 크기가 크며, 백색으로 다소성(multifocal)~미만성(diffuse)으로 분포하였고, 이하선의 병변은 크기가 큰 호염기성의 선방세포가 미만성으로 분포하였다. 선방세포의 비대는 호염기성 비대소 및 선방세포 과형성등과 진단 시 감별이 필요하다(그림 24). 호염기성 비대소는 국소적(focal)으로 관찰되는 특징이 있어, 과형성과의 감별을 위하여 세포증식을 확인

할 수 있는 PCNA염색을 실시하였다. 그 결과, 대조군과 비교시 차이가 인정되지 않아 선방세포의 증식에 의한 변화가 아닌 단순한 비대인 것으로 확인하였다. 또한, caspse-3 음성으로서 비대에 따른 세포자살 등은 확인되지 않았다. AB-PAS, AB 및 PAS 등으로 점액의 pH 변화를 확인한 결과, 점액의 염색성에는 대조군과 비교시 차이가 없었다. 선방세포의 비대는 침 분비가 요구되는 경우나, α 및 β -카테콜라민 수용체와 관련된 교감 신경의 자극시에 관찰되는 것으로 알려져 있다(Gopinath et al., 1987; Nolte et al., 2016). 본 연구에서 관찰된 선방세포 비대는 13주보다 독성이 더 심했던 2주 노출 시험에서는 악하선에서만 관찰되었으나, 13주 노출 시험에서는 악하선과 이하선 모두에서 관찰되었다는 점을 고려할 때, 흡입노출시 털 등에 잔존한 시험물질을 그루밍 등의 과정에서 섭취함으로써 관련 병변이 유발되었을 가능성이 있다고 판단된다.



<그림 24> 침샘 선방 세포 비대의 원인 및 감별진단 모식도

고환은 조직병리학적 검사 결과, 2주 노출 시험에서 7단계 정세포의 변성이 관찰되었고, 13주 노출 시험에서는 NMF에 기인한 변화가 관찰되지 않았다. PAS 염색 및 SEM 분석결과에서도 대조군과 비교시 차이는 관찰되지 않았다.

7단계 정세포의 변성은 체중감소와 관련이 있는 변화로 알려져 있으며(Everds et al., 2012; Rehm et al., 2008), 그 외의 손상은 확인되지 않아 본 연구에서는 고환의 변화는 체중 감소에 기인한 2차적인 변화인 것으로 판단하였다.

자궁은 조직병리학적 검사 결과에서 2주 및 13주 노출 시험 모두에서 위축이 관찰되었다. 형태적으로 위축과 발정휴지기는 유사한 특징을 보인다. 발정휴지기(diestrus)가 지속되는 경우에는 점액분비기(mucification)가 관찰되는 것으로 알려져 있어(Vidal et al., 2013), AB-PAS 염색을 통해 점액분비기를 확인하였다. 그 결과, 자궁 경부의 점액 분비는 대조군과 비교시 차이가 관찰되지 않았다. 자궁의 위축은 난소에서 성호르몬 생성 억제, 성호르몬 수용체와의 결합을 방해하거나, 절식 등에 의해 유발된다(Vidal et al., 2013; Everds et al., 2013). 이에 난소에서 생성되는 성호르몬인 estradiol의 농도를 분석하였으나, 혈중 estradiol농도는 대조군과 비교시 유의한 차이가 확인되지 않아, 그 원인을 확인할 수 없었다. 이에 대해서는 추가적인 연구가 필요한 것으로 사료된다.

폐는 조직병리학적 검사, trichrome, AB-PAS 염색 모두에서 대조군과 비교시 차이가 관찰되지 않았다. 이는 폐에서는 손상에 대한 반응이 없음을 의미하며, 따라서 NMF에 의한 폐의 영향은 없다고 판단하였다.

V. 결론

본 연구에서는 흡입독성시험에서 조직병리학적 변화가 관찰된 간, 비강, 침샘, 수컷 고환, 암컷 자궁 등에 대해 형태적 특징을 분석하여 변화의 원인을 확인하고자 하였다.

간의 병변은 간 대사 효소인 cytP450 2E1의 유도과 관련이 있었으며, 비강의 병변은 cytP450 2E1과 관련이 없었다. 침샘의 병변은 선방세포 과형성이 아닌 선방의 단순 비대로 확인되었고, 고환의 병변은 체중감소에 기인한 2차적인 변화로 판단되었다. 자궁 변화의 원인은 특정할 수 없었다. 폐에서는 NMF에 기인한 병변이 유발되지 않았다.

본 연구에서는 간세포 창백/비대 이외의 병변에 대한 원인은 확인할 수 없었다. 그러나 각 병변의 형태적인 특징을 규명함으로써, 발생 원인의 접근방향을 제시하였으며, 각 병변의 기전에 대한 규명은 추가 연구를 통해 가능할 것으로 생각된다.

NMF는 물질안전보건자료에서도 건강 유해성 정보가 제공되고 있지 않아, 본 연구를 통해 근로자에게 NMF의 독성정보를 제공하고 노출 기준 설정을 위한 추가 연구의 근거를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

김기웅, 정은교, 박승현 등. LCD 제조공정 유해요인 특성 연구 III. 안전보건공단 산업안전보건연구원; 2016.(183쪽)

최상준, 김인아, 임자운. 국내외 생식독성 화학물질 등의 유해인자 규제관리 실태분석 및 제도개선 연계방안 연구. 안전보건공단 산업안전보건연구원; 2017.(68쪽)

伊東信行. 독성병리학. 도서출판 샤론;1998.(61-90쪽.)

Budavari S.(ed). The Merck Index-An Encyclopedia of chemicals, drugs, and biological. Whitehouse station, New Jersey:Merck and Co.,Inc.; 1996. p.1037

Buhler DR and Reed DJ. Ethel Browning's toxicity and metabolism of industrial solvents. New York;Elsevier;1990. p.V2 170

Cattley CR, Popp AJ, Vonderfecht LS. Liver, gallbladder, and exocrine pancreas. In: SahotaSP, PoppAJ, HardistyFJ et al., editors. Toxicologic pathology, Florida:CRC press; 2013. p.323-324

EverdsEN, SnyderWP, BaileyLK et al. Interpreting stress responses during routine toxicity studies: A review of the biology, impact, and assessment. Toxicol Pathol 2012;00:1-55

FangY-Z, YangS, WuG. Free radicals, antioxidants, and nutrition. Nutrition 2002;18(10):872-879

Gopinath C, Prentice ED, Lewis JD. Atlas of experimental toxicological pathology. Lancaster:MTP press limited; 1987. p.64

GuengerichFP. Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. The AAPS Journal 2006;8(1):E101-11

Hall LR. Principles of clinical pathology. In: Sahota SP, Popp AJ, Hardisty FJ et al., editors. Toxicologic pathology. Florida:CRC press; 2013. p.157

Hansch C., Leo A, Hoekman D. Exploring QSAR-Hydrophobic, electronic, and steric constants. Washington,DC: American Chemical Society; 1995. p.4

KennedyGL, FerenzJrRL, BurgessBA *et al.* 2-Week inhalation study of N-monomethylformamide in rats. Fundamental and applied toxicology 1990;14:810-816

Krishan K and White P. Pharmacokinetics and Toxicokinetics. In: Haschek WM, Rousseaux CG, Wallig MA et al., Editors. Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology. 3rd ed. California:Elsevier; 2013. p.V1 39-59.

Lide DR and Milne GWA(eds.). Handbook of data on organic compounds.

3rd ed. Florida;CRC press, Inc.; 1994., p.V1 2813

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database;created in 2005 CID=31254, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/31254> (accessed on Jan. 24, 2019).

NolteT, Brandler-WeberP, DanglerC et al. Nonproliferative and proliferative lesions of the gastrointestinal tract, pancreas and salivary glands of the rat and mouse. J Toxicol Pathol 2016;29:1S-124S

Patrick JD and Mann CP. Routine and special techniques in toxicologic pathology. In: Sahota SP, Popp AJ, Hardisty FJ et al., editors. Toxicologic pathology. Florida;CRC press: 2013. p.109

PearsonGP, GescherA, HarpurSE. Hepatotoxicity of N-methylformamide in mice- I: Relationship to glutathione status. Biochem Pharmacol 1987;36(3): 381-384

RehmS, WhiteET, ZahalkaAE et al. Effects of food restriction on testis and accessory sex glands in maturing rats. Toxicol Pathol 2008;36:687-694

ShawAJ, GescherA, MrazJ. Cytotoxicity and metabolism of the hepatotoxin N-methylformamide and related formamides in mouse hepatocytes. Toxicol Appl Pharmacol 1988;95(1):162-170

Smith SG, Walter LG, Walker MR. Clinical pathology in non-clinical toxicology testing. In: Haschek WM, Rousseaux CG, Wallig MA et al.,

Editors. Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology. 3rd ed. California;Elsevier: 2013. p.V1 582-583.

ThoolenB, MaronpotRR, HaradaT et al. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse hepatobiliary system. Toxicol Pathol 2010;38:5S-81S

ThreadgillMD, AxworthyDB, Baillie TA et al Metabolism of N-methylformamide in mice: primary kinetic deuterium isotope effect and identification of S-(N-methylcarbamoyl)glutathione as a metabolite. J Pharmacol Exp Ther 1987;242(1):312-319

TulipK and TimbrellAJ. Comparative hepatotoxicity and metabolism of N-methylformamide in rats and mice. Archives of Toxicology 1988;62(2-3): 167-176

Vidal DJ, Mirsky LM, Colman K et al. Reproductive system and mammary gland. In: Sahota SP, Popp AJ, Hardisty FJ et al., editors. Toxicologic pathology. Florida:CRC press; 2013. p.793-794

Abstract

Study on N-methylformamide-induced changes

Mi Ju Lee, Kyung-Taek Rim, Yong-Soon Kim, Hyo-Geun Cha, Byeong-uk Yu

Objectives: N-methylformamide(NMF) is used in LCD cleaning, process of synthesis for several chemicals such as insecticides. The trade volume was reported as 17,036 tons were consumed in Korea. NMF has been reported to induce hepatotoxicity. We performed 2 weeks and 13 weeks repeated inhalation toxicity study for more information of NMF and found NMF-induced salivary and nasal changes except hepatotoxicity. Here, we investigated the detail characteristics of the histopathological changes.

Methods: F344 rats were exposed to NMF vapor for 2 weeks and 13weeks. Histopathology, special stain, immunohistochemistry, scanning electron microscopy, ELISA were performed.

Results: Pale cytoplasm or hepatocellular hypertrophy and pigmentation in the liver, mononuclear cell infiltration, hemorrhage, transitional or mucus cell hyperplasia, erosion/ulcer, inflammation in the nasal cavity, acinar cell hypertrophy in the submandibular and parotid gland was noted as NMF-induced change in histopathology. Iron stain was showed positive reaction in the liver. Expression of CytP450 2E1 and caspase-3 was remarkable in the liver and nasal cavity, respectively.

Conclusions: It was considered that hepatocellular hypertrophy related to

cytP450 2E1 expression. Acinar cell hypertrophy in the salivary gland was increased production of mucus, not proliferative change.

Keywords : N-methylformamide, toxicity, rats, histopathological analysis

〈〈연 구 진〉〉

연 구 기 관 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원

연구책임자 : 이 미 주 (연구위원, 산업화학연구실)

연 구 원 : 임 경 택 (선임 연구위원, 산업화학연구실)

김 용 순 (연구위원, 산업화학연구실)

차 효 근 (연구원, 산업화학연구실)

유 병 옥 (연구원, 산업화학연구실)

〈〈연 구 기 간〉〉

2019. 1. 1 ~ 2019. 11. 30

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

산업안전보건연구원장

Tetrachloroethylene 유발 병변 연구

2019-연구원-1612

발 행 일 : 2019년 11월 30일

발 행 인 : 산업안전보건연구원장

연구책임자 : 산업화학연구실 이 미 주

발 행 처 : 안전보건공단 산업안전보건연구원

주 소 : (34122) 대전광역시 유성구 엑스포로 339번길 30

전 화 : (042) 869-8533

F A X : (042) 869-8694

Homepage : <http://oshri.kosha.or.kr>
