

연구보고서

흡입노출 실험동물을 이용한 생체영향 지표 연구 -호흡기계를 중심으로-

조은상·정용현·최혜연

산업재해예방

안전보건공단

산업안전보건연구원



요 약 문

연구기간

2017년 01월 ~ 2017년 11월

핵심단어

생체 지표, 바이오마커, 흡입독성시험, 혈액

연구과제명

흡입노출 실험동물을 이용한 생체영향 지표 연구-호흡기계를 중심으로

1. 연구배경

생체지표(biomarker)는 자극에 대한 생체의 변화를 탐지해 낼 수 있는 일종의 정보로 화학 물질에 대한 체내 대사산물로 대표될 수 있다. 종양 지표 등 다양한 생체 지표들이 인정되고 새롭게 개발되고 있지만 독성 시험에서 주로 사용되고 있는 지표들은 한정적이고 장기적 자극에 의한 손상을 탐지하는 지표가 대부분이다. 이에 흡입 독성연구센터에서 독성 시험을 수행 중인 동물을 이용해 흡입독성시험의 결과를 조기에 예측하고, 신뢰성을 향상시킬 수 있는 유용한 생체 지표를 실험적으로 탐색하려고 한다.

2. 주요 연구내용

- 연구결과 -

- 1) 생체지표의 특성 및 용도에 따른 분류와 산업보건 측면에서의 생체지표의 기존 활용 범위를 조사 연구하였다.
- 2) 일반적인 독성시험에서 활용되고 있는 생체 지표를 문헌 조사한 결과 흡입독성연구센터에서 수행하는 동물시험에서 분석하고 있는 생체지표와 대부분 일치하였다.

- 3) 2,6-디-삼차-부틸-파라-크레졸, 노말 프로필 알콜, 폴리헥사메틸렌구아니딘 염산염, 테트라클로로에틸렌을 이용해 랫드에서 흡입독성 시험을 수행해 혈액 및 장기 시료를 분석했다.
- 4) 호흡기의 염증과 관련 있는 것으로 알려진 지표인 vWF, IL-1 β IL-10, IL-18, IL-2, IL-6, 및 VEGF의 농도는 시험물질에 의한 변화를 나타내지 않았다.
- 5) 동일한 실험에서 기존에 수행해 왔던 혈액 생화학 검사를 통한 혈액 내 지표와 현미경 검경을 통한 장기의 형태학적 변화가 관찰되었다.
- 6) 소량의 시료를 이용하기 위해 실시한 Luminex 기법은 검출 농도의 한계로 저농도에서 분석의 신뢰도가 다소 감소되었다.

- 시 사 점

특정 장기의 정확한 생체 지표 분석을 위해 장기 조직을 이용하거나 유전체 연구를 통한 분석이 민감성과 효율적 측면에서 유용할 것으로 생각된다.

3. 연구 활용방안

- 제 언

연구 결과를 통해 화학물질에 의한 장기 손상 기전 연구에 기여하고, 근로자의 건강 유해성 평가에 기초 자료를 마련할 수 있을 것으로 판단된다.

- 활 용

- 신규 화학물질의 연구 결과보고서 배포를 통해 기초 연구에 활용
- 유관학회(한국독성학회 등) 학술대회 발표 예정

4. 연락처

- 산업안전보건연구원 산업화학연구실 병리검사부 조은상
- ☎ 042) 869. 8534
- E-mail escho@kosha.or.kr

차 례

요약문	i
I. 개요	1
1. 연구 배경 및 필요성	1
1) 생체 지표의 정의	1
2) 생체 지표의 조건	1
3) 생체 지표의 종류	2
4) 생체 지표의 활용	3
2. 연구 목표	9
1) 선행 연구 조사를 통한 현행 생체 지표의 정리	9
II. 연구 내용 및 방법	10
1. 연구 체계	10
2. 선행 연구 분석	11
1) 국내·외 활용 임상 및 동물 생체 지표 조사	11
2) 주로 이용되는 분석 시료의 범위 조사	11
3) 분석 가능한 생체 지표 선정	11
3. 실험 방법	11
1) 시험 물질	11
2) 랫드를 이용한 흡입독성시험	12
3) 혈액 시료 분석	23
4) 일반 조직병리검사	30

III. 연구 결과	32
1. 선행 연구 분석	32
1) 장기 별 주요 독성 기전 및 생체 지표	32
2) 생체 지표 분석에 사용되는 주요 시료의 종류 및 장단점	42
2. 시료 분석 결과	44
1) 랫드를 이용한 급성흡입독성시험	44
2) 랫드를 이용한 아급성 흡입독성시험	46
3) 랫드를 이용한 아만성 흡입독성시험	49
4) 랫드를 이용한 만성 흡입독성시험	52
3. 조직병리학적 검사 결과	55
1) 랫드를 이용한 급성 흡입독성시험	55
2) 랫드를 이용한 아급성 흡입독성시험	55
3) 랫드를 이용한 아만성 흡입독성시험	55
4) 랫드를 이용한 만성 흡입독성시험	55
IV. 고찰	57
V. 결론	61
참고문헌	62
Abstract	75

표 차 례

<표 I-1> 특성 및 용도에 따른 생체 지표의 분류	2
<표 I-2> 단계적 특성 및 용도에 따른 생체 지표의 분류	3
<표 I-3> 물질 별 생물학적 노출지표와 생체 지표	4
<표 I-4> 일반 독성시험의 주요 생체 지표	7
<표 II-1> 시험 물질의 종류 및 특성	11
<표 II-2> 급성 시험군의 구성 및 노출 농도	13
<표 II-3> 아급성 시험군의 구성 및 노출 농도	14
<표 II-4> 아급성 시험의 고정 조직	16
<표 II-5> 아만성 시험군 구성 및 노출 농도	17
<표 II-6> 아만성 시험의 고정 조직	19
<표 II-7> 만성 시험군의 구성 및 노출 농도	20
<표 II-8> 만성 시험의 고정 조직	22
<표 II-9> 혈액생화학적 검사의 분석 항목	23
<표 II-10> 시험 별 혈액 시료	26
<표 II-11> 분석 생체 지표의 종류 및 조합	27
<표 III-2> 간 특이적 생체 지표의 종류 (IHCPT 기준)	38
<표 III-3> 간의 대표적 생체 지표의 종류와 기능	39
<표 III-4> 신장 특이적 생체 지표의 종류	41
<표 III-5> 실험적 신장 특이 생체 지표의 종류	41
<표 III-6> 생체 지표의 분석을 위한 시료의 종류 및 장·단점	43

<표 III-7> 노말 프로필 알콜을 이용한 아급성 흡입시험의 혈액생화학적 분석 결과	46
<표 III-8> 폴리헥사메틸렌구아니딘 염산염을 이용한 아만성 흡입시험의 혈액생화학적 분석 결과	49
<표 III-9> 테트라클로로에틸렌을 이용한 만성 흡입시험의 혈액생화학적 분석 결과	52

그 립 차 례

[그림 I-1] 신약개발 과정 중 생체 지표의 활용	3
[그림 II-1] 연구체계도	10
[그림 II-2] 급성 흡입시험의 노출 모식도	13
[그림 II-3] 아급성 흡입시험의 노출 모식도	15
[그림 II-4] 아만성 흡입시험의 노출 모식도	18
[그림 II-5] 만성 흡입시험의 노출 모식도	21
[그림 II-6] 시료 분석용 분석기기(Luminex 200 system)	24
[그림 II-7] 비드를 이용한 분석기기의 원리	25
[그림 II-8] 표준물질의 희석 모식도 (Panel 1)	27
[그림 II-9] 표준물질의 희석 모식도 (Panel 2)	29
[그림 II-10] Panel 2의 실험과정 모식도	30
[그림 II-11] 염색과정의 작업 모식도	31
[그림 III-1] 급성 폐 손상시 폐포와 모세혈관에 작용하는 생체 지표	33
[그림 III-2] 만성폐쇄성폐질환의 주요 사이토카인과 연관성	34
[그림 III-3] 알러지성 천식의 병인 모식도	35
[그림 III-4] 2,6-디-삼차-부틸-파라-크레졸을 이용한 급성 흡입시험의 동물 혈액 시료 내 생체 지표 분석	45
[그림 III-5] 노말 프로필 알콜을 이용한 아급성 흡입시험의 동물 혈액 시료 내 생체 지표 분석	48
[그림 III-6] 폴리헥사메틸렌구아니딘 염산염을 이용한 아만성 흡입시험의 동물 혈액 시료내 생체 지표 분석	51
[그림 III-7] 테트라클로로에틸렌을 이용한 만성 흡입시험의 동물 혈액 시료내 생체 지표 분석	54

I. 개 요

1. 연구 배경 및 필요성

1) 생체 지표의 정의

생체 지표(Biomarker)는 일종의 분자적 정보로 신체의 변화를 감지할 수 있는 지표로 알려져 있다. 일반적으로 질병의 발병과 진행에 의해 탐색될 수 있는 체내 DNA, RNA, 대사 산물, 단백질 등의 변화를 말하며, 질병 뿐 아니라 새로운 약물의 개발 목적과 체외에서 질병을 조기 발견해 예후를 예측하는 체외 분자진단 기술 등의 개발에 이용되고 있다.

생체 지표는 1980년에 처음으로 용어화 된 이후 범위 및 정의는 다양하게 알려져 있지만, 대표적으로 미국 국립 보건원 (NIH, National Institute of Health)에서는 ‘정상적인 생체의 과정, 질병 상태의 과정, 또는 치료제에 대한 약리적 반응을 객관적으로 측정 및 평가할 수 있는 특성’으로 정의하고 있다. 또한 NIH 산하 미국 국립 암연구소 (NCI, National Cancer Institute)는 생체 지표의 정의 중 ‘특성(characteristic)’을 혈액, 기타 체액, 조직 등에서 정상 또는 질병 상태일 때 신체의 반응을 관찰될 수 있는 생물학적 분자 단위로 확대해 정의하고 있다 (NCI, 2017).

2) 생체 지표의 조건

생체 지표는 다양한 지표로 정의될 수 있다. 그러나 실제로 널리 응용되기 위해서 이상적으로 갖추어야 할 조건이 있다. 일단 특정 질병의 진단에 민감하고 특이적이어야 하고, 질병마다 존재하는 세부분류(아형)를 감별할 수 있어

야 한다. 간편하게 채취 및 측정 가능할 수 있고 채취 시 비침습적 방법으로 수행할 수 있어야 한다. 또한 가능한 특정 질병이 진행되는 과정중의 단계별 구별이 가능해야 하며 신속하게 검사 가능할 수 있어야 한다.

3) 생체 지표의 종류

(1) 특성 및 용도에 따른 분류

목적에 따라 다양한 분류의 생체 지표를 이용할 수 있으며 동일한 마커라 할지라도 다른 목적에 이용될 수 있다. 생체 지표의 특성 및 용도에 따른 분류는 <표 I-1>과 같다.

<표 I-1> 특성 및 용도에 따른 생체 지표의 분류

종 류	특 징
선별적 생체 지표 (screening biomarker)	건강한 사람과 임상증상이 없더라도 어떤 질병이 시작되는 사람을 구분할 수 있는 생체 지표로 초기 암 진단마커가 해당함
예후적 생체 지표 (Prognostic biomarker)	질병의 예후를 알려주는 마커로서 관절염의 진정도를 알려주는 바이오마커 등이 해당됨
계층적 생체 지표 (Stratification biomarker)	특정 약물에 대한 반응군과 비반응군을 구분할 수 있는 생체 지표
유효성 생체 지표 (Efficacy biomarker)	약물 치료의 효과를 모니터링할 수 있는 생체 지표로 대리표지자 (surrogatebiomarker)로도 사용될 수 있으며 신약 개발 단계에서 특정약물에 대한 연구 개발을 계속할 것인지 결정할 때 판단근거가 됨
메커니즘 생체 지표 (Mechanism of action biomarker)	타겟에 대한 약물의 효과를 정량화할 수 있는 생체 지표
독성감별 생체 지표 (Toxicity biomarker)	특정약물에 대한 부작용 증상을 나타난 그룹을 찾아낼 수 있는 마커
변환적 생체 지표 (Translation biomarker)	전임상과 임상시험에서 모두 사용할 수 있는 생체 지표 즉, 실험동물과 사람에서 동일한 양상을 보이는 생체 지표
질병 생체 지표 (Disease biomarker)	질환 유무 또는 임상결과를 보여주는 생체 지표
단계적 생체 지표 (Staging biomarker)	진행성질병에서 각 단계를 구분할 수 있는 마커
대체적 생체 지표 (Surrogate biomarker)	Clinical end point를 대체할 수 있는 마커
표적 생체 지표 (Target biomarker)	약물타겟의 존재를 측정할 수 있는 마커

(자료: 임춘화, 2013; Insight Pharma Reports, 2007 and 2009)

(2) 적용 단계에 따른 분류

암 진단 등에 이용되는 생체 지표들은 암의 치료 과정 중 적용되는 관리적 의미로 분류할 수 있다. 단계별 및 용도에 따른 분류는 <표 I-2>과 같다.

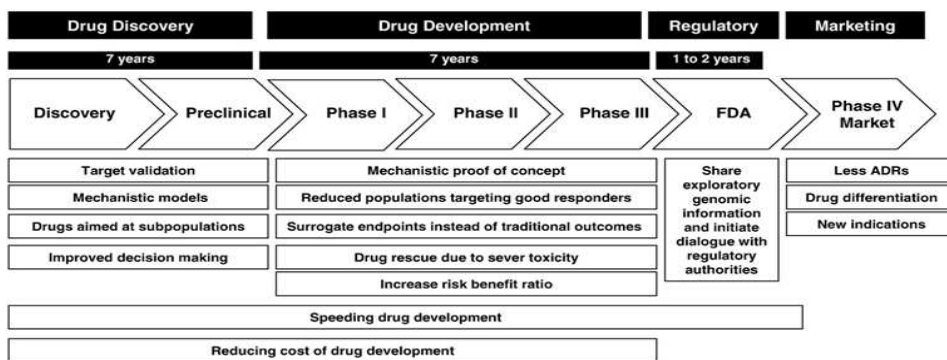
<표 I-2> 단계적 특성 및 용도에 따른 생체 지표의 분류

종 류	특 징
예후 생체 지표 (Prognostic biomarker)	암세포의 진행 과정을 예측하여 예후의 정도를 판단해 항암제 등의 치료 방향을 결정하도록 도움을 주는 마커
반응예측 생체 지표 (Predictive biomarker)	특정 약물에 대한 환자의 반응을 예측할 수 있는 마커로 환자 내 특정 유전자의 증폭에 따른 약물의 감수성을 판단 가능
약역학 생체 지표 (Pharmacodynamic biomarker)	신약 개발의 초기 단계에서 질병 별 특성에 따라 최대용량을 가감해야 하는 경우에 이용되는 마커

4) 생체 지표의 활용

(1) 신약 개발

위 분류와 같이 목적에 따라 다양한 생체 지표를 이용할 수 있으며, 최근의 생체 지표는 질환의 치료, 관리 및 조기진단 뿐만 아니라, 신약 개발 및 맞춤형학(Personalized medicine)에도 널리 이용되고 있다. 주로 신약 개발 과정 [그림 I-1] 중 효능 검정 또는 임상시험기간 단축 등의 목적으로 개발되어 이용되고 있다.



[그림 I-1] 신약개발 과정 중 생체 지표의 활용

(자료: Amir-Aslani and Mangematin, 2010)

(2) 생물학적 노출지표의 확인

또한 산업안전보건법에 따라 업무중 노출가능성이 있는 유해한 물질들에 대해 특수건강진단을 통해 근로자의 유해물질 노출 정도를 판별하기 위해 시료를 채취·분석해 노출기준에 적합한지 여부를 판별하는 용도로 사용되기도 한다(고용노동부, 2017). 현재 미국 산업위생전문가협회(ACGIH, Association Advancing Occupational and Environmental Health) 등의 정보를 이용하여 국내 자체적으로 생물학적 노출지표(BEI, Biological exposure index)를 설정하여 이용하고 있다. 대부분 이용되는 생체 지표들은 소변, 혈액 또는 날숨 등의 시료를 채취하여 대사산물로서 분석되고 있다(산업안전보건연구원, 2015). 현재 분석되고 있는 물질종류별 시료 및 생체 지표를 <표 I-3>에 나타냈다.

<표 I-3> 물질 별 생물학적 노출지표와 생체 지표

물질 종류	구분 ¹	번호 ²	물질명	시료 종류	지표물질명	노출 기준	단위
유기 화합 물	1차	7	p니트로아닐린	혈액	메트헤모글로빈	1.5	%
		8	p니트로클로로벤젠	혈액	메트헤모글로빈	1.5	%
		9	디니트로톨루엔	혈액	메트헤모글로빈	1.5	%
		10	디메틸아닐린	혈액	메트헤모글로빈	1.5	%
		12	NN-디메틸아세트아미드	소변	N-메틸아세트아미드	30	mg/g crea. ³
		13	디메틸포름아미드	소변	N-메틸포름아미드	15	mg/L
		35	메틸클로로포름 (1,1,1-트리클로로에탄)	소변	삼염화초산	10	mg/L
				소변	총삼염화에탄올	30	mg/L
		53	아닐린과 동족체	혈액	메트헤모글로빈	1.5	%
		62	에틸렌글리콜 디니트레이트	혈액	메트헤모글로빈	1.5	%
		81	크실렌	소변	메틸마노산	1.5	g/g crea.
		88	톨루엔	소변	마노산	2.5	g/g crea.
		93	트리클로로에틸렌	소변	총삼염화물	300	g/g crea.
				소변	삼염화초산	100	g/g crea.

물질 종류	구분 ¹	번호 ²	물질명	시료 종류	지표물질명	노출 기준	단위
		95	퍼클로로에틸렌	소변	삼염화초산	5	mg/L
		105	헥산(n-헥산)	소변	2,5-헥산디온	5	mg/g crea.
	2차	11	p디메틸아미노아조벤젠	혈액	메트헤모글로빈	1.5	%
		19	디클로로메탄 (이염화메틸렌)	혈액	카복시헤모글로빈	3.5	%
		27	메틸 n-부틸케톤 (메틸부틸케톤)	소변	2,5-헥산디온	5	mg/g crea.
		31	메틸 알코올	소변	메탄올	15	mg/L
				혈액	에탄올		
		32	메틸 에틸케톤	소변	메틸에틸케톤	2	mg/L
		33	메틸이소부틸케톤	소변	메틸이소부틸케톤	2	mg/g crea.
		36	벤젠(1 ppm 기준)	소변	뮤콘산	1	mg/g crea.
				혈액	벤젠	5	μg/L
			벤젠(10 ppm 기준)	소변	페놀	50	mg/g crea.
		55	아세톤	소변	아세톤	80	mg/L
		60	2-에톡시에탄올 (에틸렌 글리콜 모노에틸 에테르, 셀로솔브)	소변	2-에톡시초산	100	mg/g crea.
		74	이소프로필알코올	혈액	아세톤	50	mg/L
				소변		50	mg/L
		79	콜타르	소변	1-하이드록시파이렌	4.6	μg/L
		84	클로로벤젠	소변	총클로로카테콜	150	mg/g crea.
		96	페놀	소변	페놀	250	mg/g crea.
		97	펜타클로로페놀	소변	펜타클로로페놀		mg/g crea.
				혈액	유리펜타클로로페놀	5	mg/L
	권장	36	벤젠(1 ppm 기준)	소변	S-페닐머캅토산	50	μg/g crea.
		48	스티렌	소변	만셀릭산+ 페닐글리옥실산	600	mg/g crea.
		76	이황화탄소	소변	TTCA	5	mg/g crea.
		88	톨루엔(50 ppm 기준)	소변	o-크레졸	0.8	mg/L
				혈액	톨루엔	1	mg/dL
		95	퍼클로로에틸렌	혈액	퍼클로로에틸렌	1	mg/dL

물질 종류	구분 ¹	번호 ²	물질명	시료 종류	지표물질명	노출 기준	단위
금속 류	1차	2	납과 그 무기화합물	혈액	납	30	μg/dL
		8	수은과 그 화합물	소변	수은	200	μg/L
		11	4알킬연	혈액	납	30	μg/dL
		16	카드뮴과 그 화합물	혈액	카드뮴	5	μg/L
	2차	2	납과 그 무기화합물	소변	납	150	μg/L
				혈액	ZPP	100	μg/dL
				소변	δALA	5	mg/L
		3	니켈과 그 화합물	소변	니켈	80	μg/L
		7	삼산화비소	소변	비소	220	μg/L
		8	수은과 그 화합물	혈액	수은	15	μg/L
		9	안티몬과 그 화합물	소변	안티몬		
		11	4알킬연	소변	납	150	μg/L
				혈액	ZPP	100	μg/dL
				소변	δALA	5	mg/L
		12	오산화바나듐 (분진 및 흡)	소변	바나듐	50	μg/g crea.
		16	카드뮴과 그 화합물	소변	카드뮴	5	μg/g crea.
				소변	β-미이크로글로불린	300	μg/g crea.
		18	크롬과 그 화합물	소변	크롬	30	μg/g crea.
				혈액	크롬		
		4	망간과 그 화합물	혈액	망간	36	μg/L
산및 알칼 리류	2차	2	불화수소(불산)	소변	불화물	10	mg/g crea.
	권장	6	질산	혈액	메트헤모글로빈	1.5	%
가스	1차	11	일산화탄소	혈액	카복시헤모글로빈	5	%
				호기	일산화탄소	40	ppm
	2차	2	브롬	혈액	브롬이온		
		4	삼수산화비소	혈액	비소		μg/dL
				소변	비소		μg/L

¹구분 : 건강진단의 1차 항목에 포함되거나 2차 항목 검사 시 필요하다고 인정되는 경우 실시하는 노출지표물질

²번호 : 산업안전보건법 시행규칙 [별표 13] 특수건강진단·배치전건강진단·수시건강진단의 검사항목상 번호임

³crea. : creatinine(크레아티닌)

(자료 : 산업안전보건연구원. 근로자건강진단 실무지침 제 1권 특수건강진단)

(3) 동물을 이용한 일반 독성시험

또한 대부분의 일반 독성시험에서 시험 종료 후 동물의 생체 시료 분석을 통해 생체 지표들을 탐색하고 특정 장기 손상 및 메카니즘 분석에 이용하고 있다 (OECD, 2009). 현재 연구원 내 산업화학연구실에서 수행중인 흡입독성시험들에 대해서도 동물의 혈액, 소변 또는 기관지폐포세척액(BALF, Bronchiol-aleveolar lavage fluid)의 분석을 통해 다양한 마커를 분석하고 있다. 일반 독성시험에서 주로 분석되는 생체 지표들을 <표 I-4>에 나타내었다.

<표 I-4> 일반 독성시험의 주요 생체 지표

분 류	항 목
전혈	총백혈구수 (Leucocyte, WBC)
	감별 백혈구수 (WBC differential count)
	혈색소량(Hemoglobin, HGB)
	헤마토크리트치(Hematocrit, HCT)
	혈소판수(Platelet count, PLT)
	망상적혈구(Reticulocyte count, RET)
	적혈구수(Erythrocyte count, RBC)
	평균적혈구헤모글로빈농도 (Mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC)
	평균적혈구용적(Mean corpuscular volume, MCV)
	평균적혈구헤모글로빈량(Mean corpuscular hemoglobin, MCH)
	프로트롬빈 시간(Prothrombin time, PT)
	부분활성트롬보플라스틴시간 (Activated partial thromboplastin time, APTT)
	하인즈체(Heinz body)
	methaemoglobin
혈청	혈당(Glucose, GLU)
	혈액요소질소(Blood urea nitrogen, BUN)
	총단백(Total protein, TP)
	알부민(Albumin, ALB)
	크레아티닌(Creatinine, CREA)
	총콜레스테롤(Total cholesterol, TCHO)
	총빌리루빈(Total bilirubin, TBIL)
	칼륨(Potassium, K)
	칼슘(Calcium, Ca)

분 류	항 목
	염소(Chloride, Cl)
	무기인(Inorganic phosphorus, IP)
	나트륨(Sodium, Na)
	트리글리세라이드(Triglyceride, TG)
	아스파테이트 아미노기전이효소 (Aspartate aminotransferase, AST)
	알라닌 아미노기전이효소(Alanine aminotransferase, ALT)
	Total bile acid
	알칼라인 포스파타제(Alkaline phosphatase, ALP)
	알부민/글로불린 비율(Albumin/Globulin, A/G ratio)
	콜린에스테라아제(Cholinesterase)
	지질(Lipids)
	호르몬(Hormones)
	산/염기 균형(Acidi/base balance)
	크레아틴키나아제(Creatine kinase)
	트로포닌(Troponins)
	동맥내가스(Arterial blood gases)
	젖산탈수소효소(Lactate dehydrogenase)
	소르비톨탈수소효소(Sorbital dehydrogenase)
	글루탐산탈수소효소(Glutamate dehydrogenase)
	감마-글루타미트랜스펩티다제(Gamma glutamyl transpeptidase)
노	성상(Appearance)
	노량(Volume)
	노삼투압(Osmolality)
	비중(Specific gravity)
	pH
	노단백(Total protein)
	요당(Glucose)
	케톤체(Ketone)
	우로빌리노겐(Urobilinogen)
	빌리루빈(Bilirubin)
	잠혈(Occult blood)
기관지폐 세척액	총백혈구수 (Leucocyte, WBC)
	감별 백혈구수 (WBC differential count)
	총단백(Total protein)
	젖산탈수소효소(Lactate dehydrogenase)

5) 연구의 필요성

흡입독성연구센터에서 수행중인 흡입독성시험의 결과 중 일반적인 조직병리 검사 및 임상병리검사에서 관찰되는 슬라이드상의 병변 및 혈액생화학적 지표들은 조직의 손상이 일정기간 진행되어야 형태 및 수치상의 변화를 확인 할 수 있는 지표로 빠른 탐색이 어려운 단점이 있다. 따라서 기존의 생체 지표 탐색 또는 새로운 생체 지표의 개발을 통해 흡입독성시험의 범위 및 기간을 단축하고 특정 장기 독성을 예측하려는 노력이 필요하다.

2. 연구 목표

1) 선행 연구 조사를 통한 현행 생체 지표의 정리

현재 임상병리학적으로 또는 연구적으로 이용·개발되고 있는 생체 지표의 문헌 조사를 통해 장기별, 질병 별 알려진 마커들을 정리하고, 실험적으로 연구되고 있는 새로운 생체 지표들에 대한 정보를 탐색한다.

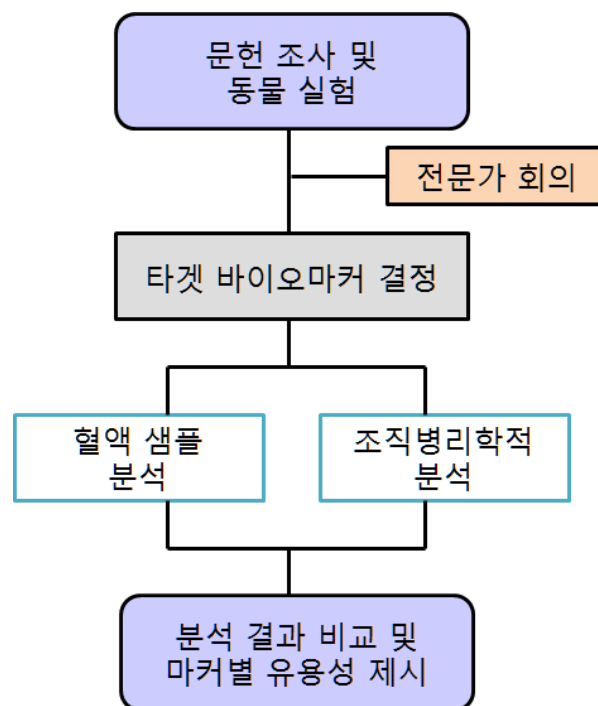
2) 유용한 생체 지표의 탐색

화학물질의 흡입 노출에 의해 민감하게 반응할 것으로 예측되는 장기 별 특정 생체 지표를 선별해 실제의 흡입독성시험의 결과와 비교·탐색한다.

II. 연구 내용 및 방법

1. 연구 체계

본 연구는 산업화학연구실 흡입독성연구센터에서 수행중인 흡입독성시험 동물을 이용하여 시료를 채취·분석해 독성 시험에서 유용한 생체 지표를 시험적으로 탐색하고자 하였다. 연구 체계도는 [그림II-1]과 같다.



[그림 II-1] 연구체계도

2. 선행 연구 분석

1) 국내·외 활용 임상 및 동물 생체 지표 조사

주요 임상검사 기관(분석전문기관, 대형병원 등)에서 실시하고 있는 분석 항목 별 체계적 정리 및 국내 주요 동물실험 기관 및 국외 가이드라인 등에서 제시되고 있는 분석 항목을 분석하고, 문헌 조사를 통한 항목 별 근거를 확보했다.

2) 주로 이용되는 분석 시료의 범위 조사

상기의 검사 항목에 주로 이용되는 시료를 항목 별 정리했다.

3) 분석 가능한 생체 지표 선정

전문가 회의를 통해 실험적으로 탐색할 수 있는 생체 지표를 선정해 흡입독성연구센터에서 수행중인 흡입독성시험의 시료에 적용했다.

3. 실험 방법

1) 시험 물질

생체 지표 탐색을 위한 동물실험에서 시료 채취를 수행한 시험물질을 <표 II-1>에 나타내었다.

<표 II-1> 시험 물질의 종류 및 특성

시험 물질	물리·화학적 특성	시험 기간
2,6-디-삼차-부틸-파라-크레졸 2,6-Di-tert-butyl- p-cresol (CAS No. 128-37-0)	분자량: 220.3536 끓는점: 265 °C 녹는점: 70 °C	급성(Acute) 2017.06

시험 물질	물리·화학적 특성	시험 기간
노말 프로필 알콜 1-Propanol (CAS No. 71-23-8)	분자량: 60.09502 밀도: 803kg/m ³ 끓는점: 97 °C 녹는점: -126 °C	아급성(Subacute) 2017.05~06
폴리헥사메틸렌구아니딘 염산염 Polyhexamethylene guanidine hydrochloride (PHMG·HCl) (CAS No. 57028-96-3)	분자량: 533.032 끓는점: 103 °C 비중: 1.089-1.098	아만성(Subchronic) 2017.05~08
테트라클로로에틸렌 Tetrachloroethylene (CAS No. 127-18-4)	분자량: 165.83 밀도: 1.62g/cm ³ 끓는점: 121.1 °C	만성(Chronic) 2016.07~2017.07

2) 랫드를 이용한 흡입독성시험

(1) 급성 흡입 독성시험(단회)

가) 시험계 및 실험군 구성

특정병원체부제(SPF, Specific pathogen free) 랫드를 중앙실험동물(Japan SLC 생산, Korea)을 통해 구매하였으며, 풍부한 시험기초자료 축적 등의 이유로 Sprague-Dawley(SD) 랫드를 선택하였다. 검역, 순화 및 관찰기간 동안에는 3마리 이하로 폴리설펴케이지(W310 x L500 x H200 mm)에서 사육하였고, 노출시에는 비부노출 흡입시험용 튜브에 수용하여 시험물질에 노출시켰다. 사료는 감마선이 조사된 실험동물용 고형사료(Teklad Certified Irradiated Global 18% Protein Rodent Diet 2918C, ENVIGO RMS Inc., U.S.A.)를 자유 급여하였다. 사료의 적정성은 공급업체에서 검사성적서를 받아 확인하였다.

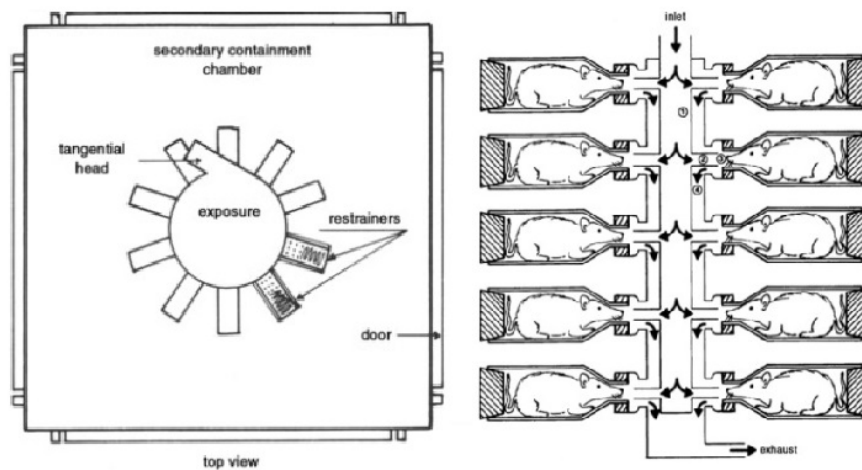
물은 미세여과기와 자외선 유수살균장치를 통과한 상수도수를 자유 급여하였다. 실험동물에게 공급되는 물은 년 1회 국가공인 검사기관((주)신성생명환경연구원)에 의뢰/검사하여 적정성을 확인하였다. 노출 농도 및 군구성은 <표 II-2>에 표시하였다.

<표 II-2> 급성 시험군의 구성 및 노출 농도

시험물질	시험계	군	농도 (mg/L)	성별	동물수
2,6-디-삼차-부틸-파 라-크레졸	SD 랫드	G1	0.05	M/F	3/3
		G2	0.5	M/F	3/3
		G3	1	M/F	3/3
		G4	2	M/F	3/3

나) 노출 방법

시험 물질의 원활한 발생을 위하여 PALAS 분진 발생장치(Dust Generator, PALAS, Parkor Korea Indus Co. LTD., Korea)를 선택하였고, 시험물질은 분진 발생장치에 넣은 후 청정공기를 주입하여 [그림II-2]와 같이 시험물질을 분무시켰다. 분무된 시험물질은 청정공기를 혼합하여 설정된 농도로 비부노출 흡입챔버내에 공급하였다. 단, 잘 응집되는 시험물질의 특성에 기인하여 발생기간 중 분진 발생장치 내 시험물질 재충진 시 또는 1시간에 한번씩 약 10분 동안 흡입 챔버 노출 부위를 청소하였다.



[그림 II-2] 급성 흡입시험의 노출 모식도

다) 부검 및 시료 채취

관찰기간 종료 후 모든 생존동물에 대해서 isoflurane 흡입을 이용하여 마취시킨 후 개복하여 복대동맥에서 혈액을 채취하고, 후대정맥 및 복대동맥을 절단하여 방혈 치사한 후 부검을 실시하였다. 부검 시 이상소견이 관찰된 장기와 폐에 대해서는 조직고정을 실시하였다.

(2) 아급성 흡입 독성시험(28일)

가) 시험계 및 실험군 구성

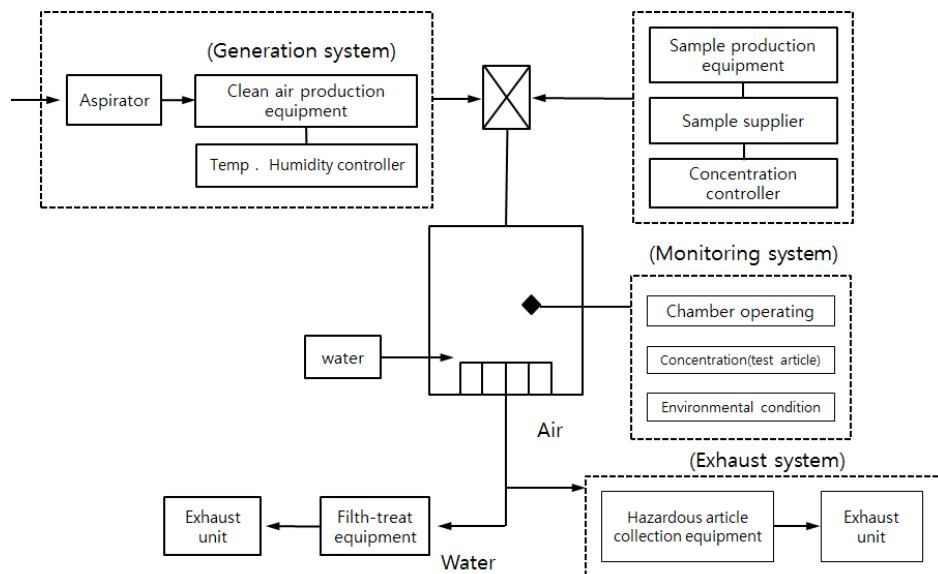
특정병원체부제(SPF, Specific pathogen free) 랫드를 중앙실험동물(Japan SLC 생산, Korea)을 통해 구매하였으며, 풍부한 시험기초자료 축적 등의 이유로 F344(Fisher 344) 랫드를 선택하였다. 검역 및 순화기간 동안에는 3마리 이하로 폴리설폰케이지(W310 x L500 x H200 mm)에서 사육하고 노출기간에는 1마리씩 2열 6연식 철망케이지(W240 x L1200 x H200 mm)에 수용하여 사육한다. 사료는 감마선이 조사된 실험동물용 고형사료(Teklad Certified Irradiated Global 18% Protein Rodent Diet 2918C, ENVIGO RMS Inc., U.S.A.)를 자유 급여하였다. 물은 미세여과기와 자외선 유수살균장치를 통과한 상수도수를 자유 급여하였다. 노출 농도 및 군구성은 <표II-3>에 표시하였다.

<표 II-3> 아급성 시험군의 구성 및 노출 농도

시험물질	시험계	군	농도 (ppm)	성별	동물수
노말 프로필 알콜	F344 랫드	Control	0	M/F	5/5
		T1	100	M/F	5/5
		T2	400	M/F	5/5
		T3	1600	M/F	5/5

나) 노출 방법

시험물질을 일정한 온도로 설정된 항온수조와 연결된 가스발생기 (Liquid Vapor Generator, LVG-04-A, HCT CO., Korea)에 넣은 후 청정공기를 주입하여 시험물질을 기화시킨다. 기화된 증기는 가능한한 실온보다 낮은 냉각콘덴서를 통과하여 응축되지 않도록 한다. 기화된 시험물질은 청정공기를 혼합하여 설정된 농도로 흡입챔버내에 공급했다. 노출은 1일 6시간, 28일 동안 실시한다. 시험 물질의 분석은 챔버 내 호흡기 근처까지 연결된 샘플링장치를 통하여 가스크로마토그래피 (Gas chromatography, TRACE1310, Thermo Scientific, USA), IR-GAS(IRGAS-LPA, CIC Photonics, USA)를 이용하여 시간당 1회 이상 측정한다. 시험시작 전 표준가스를 이용하여 3개 지점이상으로 검량선을 작성한다. 대조군은 시험물질이 포함되지 않은 청정공기만을 공급하고, 노출군과 동일한 환경을 유지한다. 시험물질의 노출 및 분석 과정의 모식도는 [그림 II-3]에 나타냈다.



[그림 II-3] 아급성 흡입시험의 노출 모식도

다) 부검 및 시료 채취

관찰기간 종료 후 계획도살 되는 동물은 부검 전에 혈액을 채취하였다. 채혈하기 전에 계획도살 되는 동물은 부검 전 16시간 이상 절식시키되 음용수는 자유급수 시킨 후 부검일에 이소플로란(isoflurane)으로 마취하여 복대동맥으로부터 혈액을 채취해 시료로 이용했다. 부검 시 이상소견이 관찰된 장기 및 지정된 장기<표 II-4>에 대해 조직고정을 실시하였다.

<표 II-4> 이급성 시험의 고정 조직

고정 조직	
Abnormal lesions(육안적 병변)	Lymph node, tracheobronchial(기관기관지림프절)
Adrenals(부신)	Nasal cavity(비강)
Animal ID(개체번호)	Ovaries(난소)
Bone marrow(골수)	Seminal vesicles(정낭)
Brain(뇌)	Spinal cords(척수)
Esophagus(식도)	Spleen(비장)
Epididymides(부고환)	Stifle joint(슬관절)
Femur(대퇴골)	Stomach(위)
Heart(심장)	Testes(고환)
Kidneys(신장)	Thymus(흉선)
Larynx(후두)	Thyroids(갑상선)
Liver(간)	Trachea(기관)
Lung(폐)	Uterus(자궁)

(3) 아만성 흡입 독성시험(90일)

가) 시험계 및 실험군 구성

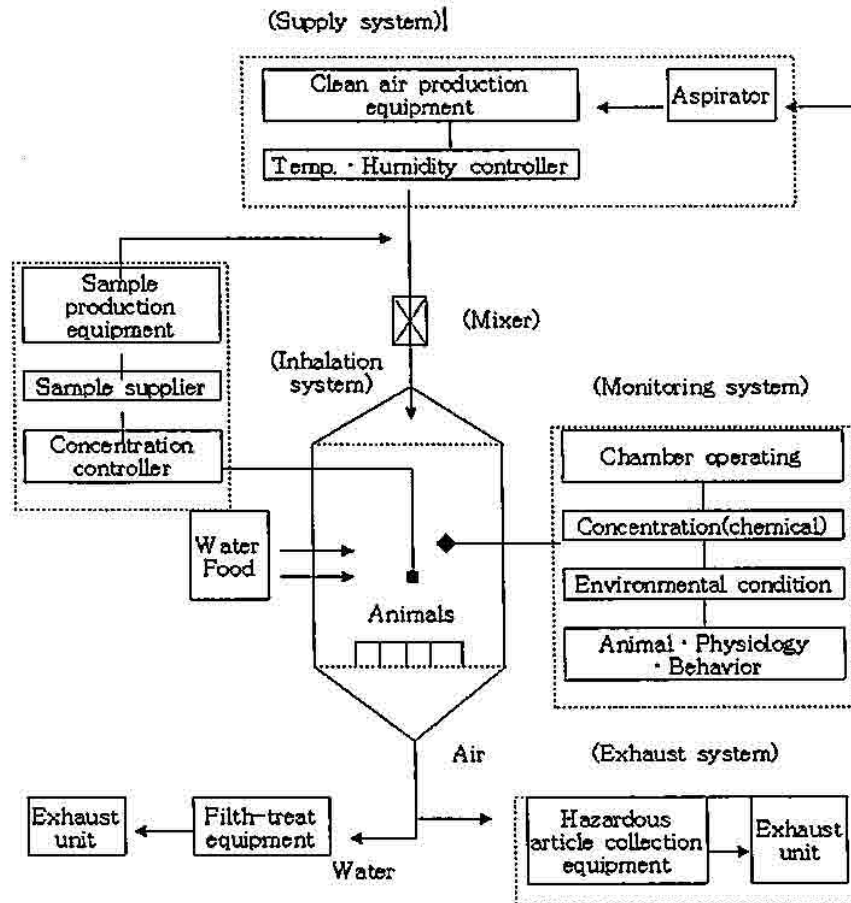
특정병원체부제(SPF, Specific pathogen free) 랫드를 중앙실험동물(Japan SLC 생산, Korea)을 통해 구매하였으며, 풍부한 시험기초자료 축적 등의 이유로 F344(Fisher 344) 랫드를 선택하였다. 검역 및 순화기간 동안에는 3마리 이하로 폴리설펀케이지(W310 × L500 × H200 mm)에서 사육하고 노출기간에는 1마리 씩 2열 6연식 철망케이지(W240 × L1200 × H200 mm)에 수용하여 사육한다. 감마선이 조사된 실험동물용 고형사료(Teklad Certified Irradiated Global 18% Protein Rodent Diet 2918C, ENVIGO RMS Inc., U.S.A.)와 미세여과기와 자외선 유수살균장치를 통과한 상수도수를 자유 급여하였다. 노출 농도 및 군구성은 <표 II-5>에 표시하였다.

<표 II-5> 아만성 시험군 구성 및 노출 농도

시험물질	시험계	군	농도 (ppm)	성별	동물수
폴리헥사메틸렌구아 니딘 염산염	F344 랫드	Control	0	M/F	10/10
		T1	0.13	M/F	10/10
		T2	0.40	M/F	10/10
		T3	1.20	M/F	10/10

나) 노출 방법

시험물질을 ultrasonic 타입의 미스트 발생기를 사용하여 발생시키고 발생된 시험물질에 공기희석장치(Aerosol dilution system, ADS)로부터 공기를 공급해 설정 농도에 맞게 희석해 챔버 내 공급한다. 대조군은 시험물질이 포함되지 않은 청정공기를 공급하고 노출군과 동일한 환경을 유지한다. 노출은 1일 6시간, 90일 동안 실시한다. 시험물질의 노출 및 분석 과정의 모식도는 [그림 II-4]에 나타냈다.



[그림 II-4] 아만성 흡입시험의 노출 모식도

다) 부검 및 시료 채취

관찰기간 종료 후 계획도살 되는 동물은 부검 전에 혈액을 채취하였다. 채혈 하기 전에 계획도살 되는 동물은 부검 전 16시간 이상 절식시키되 음용수는 자유급수 시킨 후 부검일에 이소플로란(isoflurane)으로 마취하여 복대동맥으로부터 혈액을 채취해 시료로 이용하였다. 부검 시 이상소견이 관찰된 장기 및 지정된 장기<표 II-6>에 대해 조직고정을 실시하였다.

<표 II-6> 아만성 시험의 고정 조직

고정 조직	
Abnormal lesions(육안적 병변)	Pancreas(췌장)
Adrenals(부신)	Parathyroids(부갑상선)
Animal ID(개체번호)	Pituitary(뇌하수체)
Aorta(대동맥)	Prostate(전립선)
Bone marrow(골수)	Rectum(직장)
Brain(뇌)	Salivary glands, submandibular(악하선)
Cecum(맹장)	Salivary glands, sublingual(설하선)
Colon(결장)	Salivary glands, parotid(이하선)
Duodenum(십이지장)	Sciatic nerve(좌골신경)
Epididymides(부고환)	Seminal vesicles(정낭)
Esophagus(식도)	Skeletal muscle(골격근)
Eyes(안구)	Skin(피부)
Femur(대퇴골)	Spinal cords(척수)
Harderian glands(하더선)	Spleen(비장)
Heart(심장)	Sternum(흉골)
Ileum(회장)	Stifle joint(슬관절)
Jejunum(공장)	Stomach(위)
Kidneys(신장)	Teeth(치아)
Larynx(후두)	Testes(고환)
Liver(간)	Thymus(흉선)
Lung(폐)	Thyroids(갑상선)
Lymph node, tracheobronchial(기관기관지림프절)	Tongue(혀)
Lymph node, mesenteric(장간막림프절)	Trachea(기관)
Mammary gland(유선)	Urinary bladder(방광)
Nasal cavity(비강)	Uterus(자궁)
Optic nerves(시신경)	Vagina(질)
Ovaries(난소)	

(4) 만성 흡입 독성시험(1년)

가) 시험계 및 실험군 구성

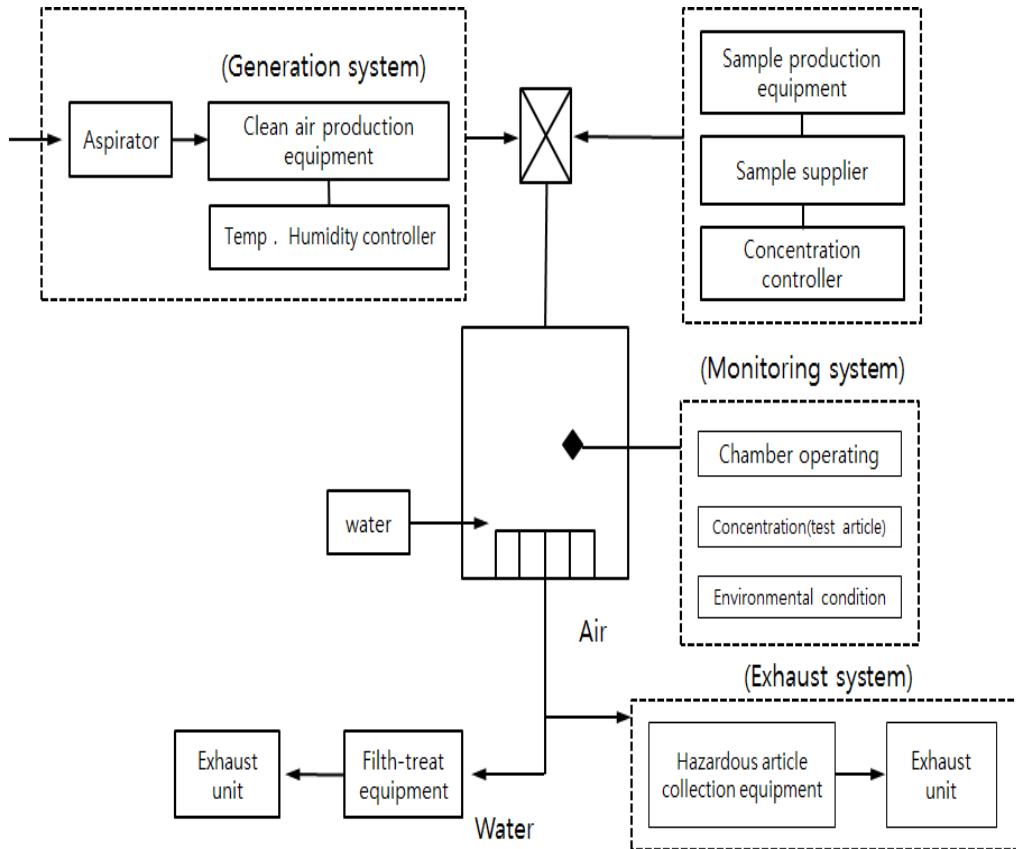
특정병원체부제(SPF, Specific pathogen free) 랫드를 중앙실험동물(Japan SLC 생산, Korea)을 통해 구매하였으며, 풍부한 시험기초자료 축적 등의 이유로 Sprague-Dawley(SD) 랫드를 선택하였다. 검역, 순화 및 관찰기간 동안에는 3마리 이하로 폴리선폰케이지(W145×L290× H200 mm)에서 사육하였고, 노출시에는 비부노출 흡입시험용 튜브에 수용하여 시험물질에 노출시켰다. 감마선이 조사된 실험동물용 고형사료(Teklad Certified Irradiated Global 18% Protein Rodent Diet 2918C, ENVIGO RMS Inc., U.S.A.)와 미세여과기와 자외선 유수 살균장치를 통과한 상수도수를 자유 급여하였다. 노출 농도 및 군구성은 <표 II-7>에 표시하였다.

<표 II-7> 만성 시험군의 구성 및 노출 농도

시험물질	시험계	군	농도(ppm)	성별	동물수
테트라클로로에틸렌	F344 랫드	G1	0	M/F	25/25
		G2	400	M/F	25/25

나) 노출 방법

시험 물질의 원활한 발생을 위하여 유기용제가스발생기(주식회사에이치씨티, 한국)에 발생된 시험물질과 청정공기를 일정비율로 조절하여 흡입챔버 상부에 부착된 혼합장치를 이용하여 혼합 사용하였다. 시험물질의 발생 및 노출과정의 모식도는 [그림 II-5]와 같다.



[그림 II-5] 만성 흡입시험의 노출 모식도

다) 부검 및 시료 채취

관찰기간 종료 후 모든 생존동물에 대해서 이소플로란(isoflurane) 흡입을 이용하여 마취시킨 후 개복하여 복대동맥에서 혈액을 채취해 시료로 이용하고, 후대정맥 및 복대동맥을 절단하여 방혈 치사한 후 부검을 실시하였다. 부검 시 이상소견이 관찰된 장기 및 지정된 장기<표 II-8>에 대해 조직고정을 실시하였다.

<표 II-8> 만성 시험의 고정 조직

고정 조직	
Abnormal lesions(육안적 병변)	Ovaries(난소)
Adrenals(부신)	Pancreas(췌장)
Animal ID(개체번호)	Parathyroids(부갑상선)
Aorta(대동맥)	Pituitary(뇌하수체)
Bone marrow(골수)	Preputial glands(포피선)
Brain(뇌)	Prostate(전립선)
Cecum(맹장)	Rectum(직장)
Clitoral glands(음핵선)	Salivary glands, submandibular(악하선)
Coagulating glands(응고선)	Salivary glands, sublingual(설하선)
Colon(결장)	Salivary glands, parotid(이하선)
Duodenum(십이지장)	Sciatic nerves(좌골신경)
Epididymides(부고환)	Seminal vesicles(정낭)
Esophagus(식도)	Skeletal muscle(골격근)
Eyes(안구)	Skin(피부)
Femur(대퇴골)	Spinal cords(척수)
Harderian glands(하더선)	Spleen(비장)
Heart(심장)	Sternum(흉골)
Ileum(회장)	Stifle joint(슬관절)
Jejunum(공장)	Stomach(위)
Kidneys(신장)	Teeth(치아)
Lacrimal glands(눈선)	Testes(고환)
Larynx(후두)	Thymus(흉선)
Liver(간)	Thyroids(갑상선)
Lung(폐)	Tongue(혀)
Lymph node, tracheobronchial(기관기관지림프절)	Trachea(기관)
Lymph node, mesenteric(장간막림프절)	Urinary bladder(방광)
Mammary gland(유선)	Uterus(자궁)
Nasal cavity(비강)	Vagina(질)
Optic nerves(시신경)	Zymbal glands(짐발선)

3) 혈액 시료 분석

(1) 혈청시료 준비

복대동맥에서 채취한 혈액을 항응고제가 없는 혈액 튜브(SST tube)에 넣고, 실온에서 30분 이상 방치시킨 후 원심분리(약 3,000 rpm, 10분)하여 혈청을 분리했다. 분리된 혈청은 분석 전까지 -80℃의 냉동고에 밀봉하여 보관하였다.

(2) 혈액생화학적 검사

혈액생화학적 검사는 <표 I-4>에 제시되었던 지표들 중 주요 장기와 관련된 지표를 선택하여 혈액생화학분석기(Toshiba 120FR Neo Chemistry analyzer, Toshiba Co., Japan)를 이용해 기본적으로 <표 II-9>의 항목에 대해 진행하였다.

<표 II-9> 혈액생화학적 검사의 분석 항목

Clinical Chemistry Parameters	
혈당(Glucose, GLU)	총빌리루빈(Total bilirubin, TBIL)
혈액요소질소(Blood urea nitrogen, BUN)	칼륨(Potassium, K)
총단백(Total protein, TP)	칼슘Calcium, Ca)
알부민(Albumin, ALB)	염소(Chloride, Cl)
크레아티닌(Creatinine, CREA)	무기인(Inorganic phosphorus, IP)
총콜레스테롤(Total cholesterol, TCHO)	나트륨Sodium, Na)
트리글리세라이드(Triglyceride, TG)	글로불린(globulin, GLO)
아스파테이트 아미노기전이효소(Aspartate aminotransferase, AST)	
알라닌 아미노기전이효소(Alanine aminotransferase, ALT)	
알칼라인 포스파타제(Alkaline phosphatase, ALP)	
크레아틴 포스포키나제(Creatine phosphokinase, CK)	

Measured by using a Toshiba 120FR NEO chemistry analyzer (Toshiba Co., Japan)

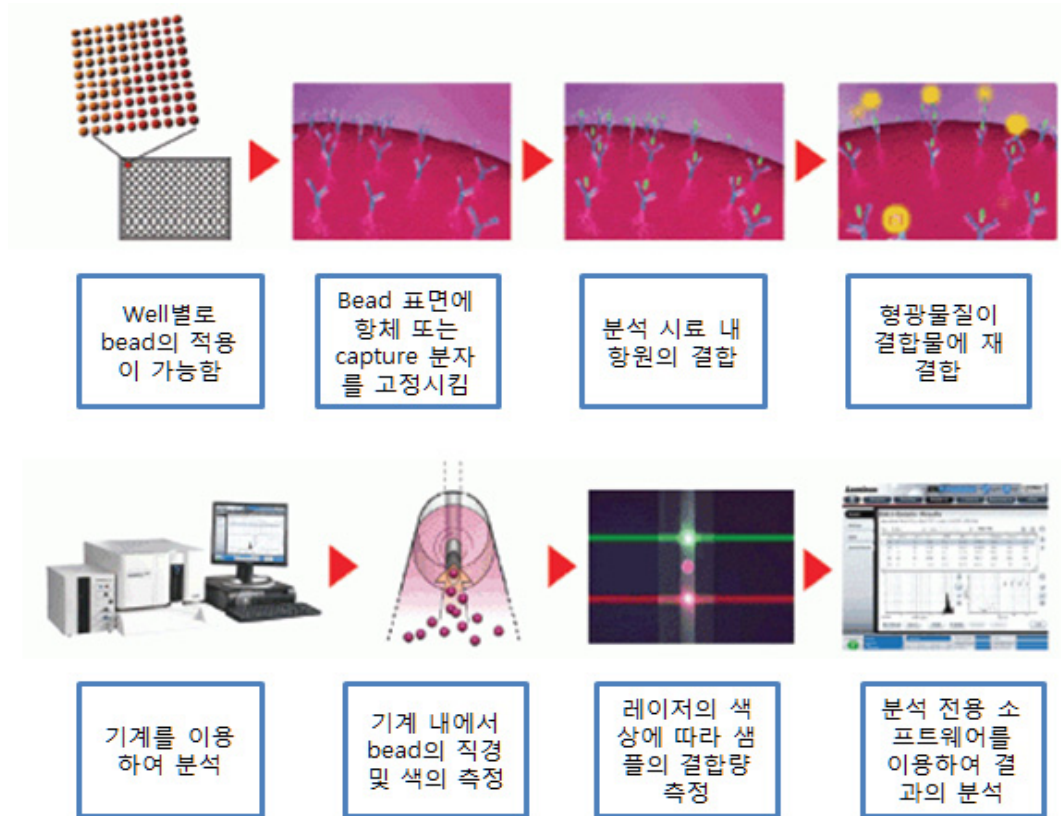
(3) 혈청 시료의 분석

루미넥스 분석 시스템(Luminex 200 system, LX200-XPON3.1)[그림 II-6]을 이용하여 혈청 내 생체 지표를 분석하였다.



[그림 II-6] 시료 분석용 분석기기(Luminex 200 system)

측정 원리는 다음과 같다. 이 분석법은 ELISA등의 분석에서 사용되는 항원 항체의 특이적 결합 반응이나 DNA chip 분석에 쓰이는 DNA의 상보적 결합 반응처럼 여러 물질이 혼합되어 있는 분석 시료에서 5.6 um 크기의 bead를 이용한다. 이용되는 bead는 두 가지 형광 염료의 형광 염색을 통하여 각각 구별할 수 있도록 형광 염색이 가능하고, 기기를 통하여 각각의 bead를 흘려보내며 각 bead의 고유번호를 구별·측정한다. 이러한 방식을 이용하여 특정 bead에 특정 항체를 붙여 시료와 한꺼번에 반응시키고 기기에서 읽을 때 bead 번호와 bead 표면에서의 분석물질의 반응 정도를 측정하는 원리이다. 특징적으로 적은 양의 시료에서 다양한 분석을 수행할 수 있는 방법이며, 대략적인 분석의 원리는 [그림 II-7]에 나타내었다.



[그림 II-7] 비드를 이용한 분석기기의 원리

분석에 사용된 시험 별 시료는 Panel의 구성에 따라 제한되었기 때문에 각 시료의 수는 <표 II-10>에 나타내었다.

<표 II-10> 시험 별 혈액 시료

시험 종류	성별	농도	분석시료 개체번호	군별 갯수	시험별 샘플갯수
급성 시험	수컷	저농도군	1,2,3	3	24
		중농도군	4,5,6	3	
		고농도군	7,8,9	3	
		최고농도군	10,11,12	3	
	암컷	저농도군	13,14,15	3	
		중농도군	16,17,18	3	
		고농도군	19,20,21	3	
		최고농도군	22,23,24	3	
아급성 시험	수컷	대조군	1,2,3,4,5	5	36
		저농도군	6,7,8,9	4	
		중농도군	11,12,13,14,15	5	
		고농도군	16,17,18,19,20	5	
	암컷	대조군	21,22,23,25	4	
		저농도군	26,27,28,29,30	5	
		중농도군	31,33,34,35	4	
		고농도군	36,37,38,39	4	
아만성 시험	수컷	대조군	1-8	8	48
		저농도군	11-18	8	
		중농도군	21-28	8	
	암컷	대조군	41-48	8	
		저농도군	51-58	8	
		중농도군	61-68	8	
만성 시험	수컷	대조군	1001,1002,1003,1004,1005,1006,1007	7	28
		고농도군	1101,1102,1103,1105,1106,1107,1108	7	
	암컷	대조군	2001,2002,2003,2004,2005,2006,2007	7	
		고농도군	2101,2102,2103,2105,2106,2107,2108	7	

(4) 측정용 생체 지표의 조합

Luminex 전용으로 제공되는 Panel을 이용하여 다양한 생체 지표를 조합해 분석하였다. 분석된 생체 지표의 종류와 조합도는 <표II-11>과 같다.

<표 II-11> 분석 생체 지표의 종류 및 조합

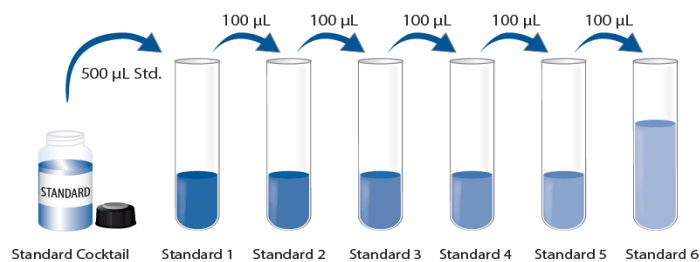
Panel	종 류	약 어
1	Interleukin-1 beta	IL-1 β
	Interleukin-10	IL-10
	Interleukin-18	IL-18
	Interleukin-2	IL-2
	Interleukin-6	IL-6
	Vascular endothelial growth factor	VEGF
2	Von Willebrand factor	vWF

(5) Panel 1의 분석

가) 시료 분석은 Magnetic Luminex Assay kit (LXSARM, R&D system Inc., USA)를 이용했다.

나) 시약 준비

- 혈청 시료 : 75 μ L를 희석액을 이용해 2배 희석했다.
- Wash Buffer : 20 mL의 농축액을 증류수에 희석해 500 mL로 만들었다.
- Standard : 농축액을 희석액을 이용해 [그림 II-8]과 같이 희석했다.



[그림 II-8] 표준물질의 희석 모식도 (Panel 1)

- Microparticle cocktail : 1000 xg로 30초간 원심분리 후 희석액을 이용해 10배 희석했다.
- Biotin antibody cocktail : 1000 xg로 30초간 원심분리 후 희석액을 이용해 10배 희석했다.
- Streptavidin-PE : 1000 xg로 30초간 원심분리 후 농축액 220 μ L을 Wash buffer 5.35 mL에 희석하여 준비했다. 과정 중 빛에 노출되지 않도록 하였다.

다) 기기를 다음과 같이 설정했다.

- 측정되는 각 분석 물질에 대해 미세 입자 영역 할당을 정했다.
- 50 events/bead로 설정
- Flow rate : 60 μ L/min
- 샘플량 : 50 μ L
- Doublet discriminator는 8000/16500으로 설정
- MFI(Median Fluorescence Intensity)를 취합했다.

라) 다음의 과정에 따라 시험을 진행했다.

- 분석 시료 및 시약을 준비했다.
- microparticle cocktail을 재부유시키고 50 μ L씩 well에 넣었다.
- Standard 또는 희석된 분석 시료를 well에 넣고 2시간동안 실온에서 반응시켰다.
- Wash buffer를 이용하여 well을 2회 세척했다.
- 희석된 Biotin antibody cocktail을 50 μ L씩 well에 넣고 실온에서 1시간동안 반응시켰다.
- Wash buffer를 이용하여 well을 2회 세척했다.
- 희석된 Streptavidin-PE를 50 μ L씩 well에 넣고 실온에서 30분간 반응시켰다.
- Wash buffer를 이용하여 well을 2회 세척했다.
- Wash buffer를 100 μ L 넣고 microparticle을 재 부유시킨 후 2분간 교반했다.

- 기기를 이용해 90분 이내 분석된 기기값을 기록했다.

마) 결과의 분석

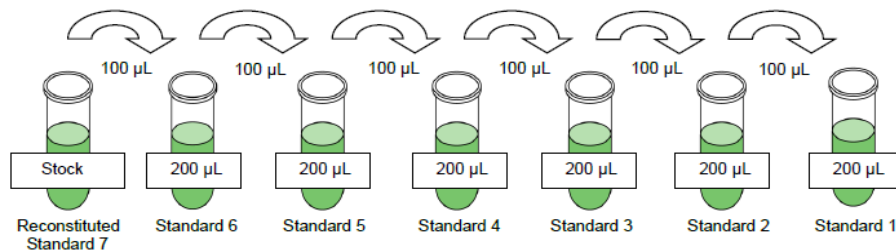
- 리딩된 값에 대해 5-파라미터 분석을 실시해 Standard의 비교를 통해 농도 값을 계산했다.

(6) Panel 2의 분석

가) 시료 분석은 Milliplex MAP (RV2MAG-26K, Millipore, USA)를 이용했다.

나) 시약 준비

- 혈청 시료 : 희석액을 이용해 80배 희석했다.
- Wash Buffer : 농축액을 증류수에 10배 희석했다.
- Standard : 희석액을 이용해 [그림 II-9]과 같이 희석했다.



[그림 II-9] 표준물질의 희석 모식도 (Panel 2)

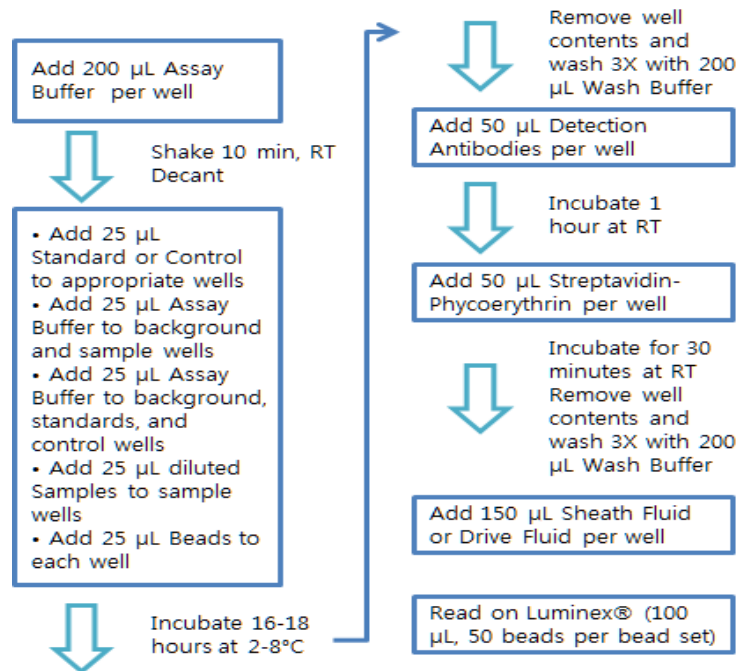
- Antibody-immobilized bead : 30초간 초음파를 가하고 1분간 격렬하게 흔들었다. 원액 150 uL와 Assay buffer를 이용해 총 3mL의 희석액을 만들었다.

다) 기기를 다음과 같이 설정했다.

- 측정되는 각 분석 물질에 대해 미세 입자 영역 할당을 정하였다.

- 50 events/bead로 설정
- 샘플량 : 100uL
- Gate setting : 8,000/15,000
- MFI(Median Fluorescence Intensity)를 취합했다.

라) 다음의 과정에 따라 시험을 진행했다.[그림 II-10]



[그림 II-10] Panel 2의 실험과정 모식도

4) 일반 조직병리검사

(1) 조직의 삭정(Trimming) 및 포매(Embedding)

가) 조직의 고정은 10% 중성포르말린 용액을 이용했다.

나) 흡입독성연구센터의 표준작업지침(SOP, Standard operating procedure)에 따라 고정된 조직을 삭정해 카세트에 넣고 재고정을 실시했다.

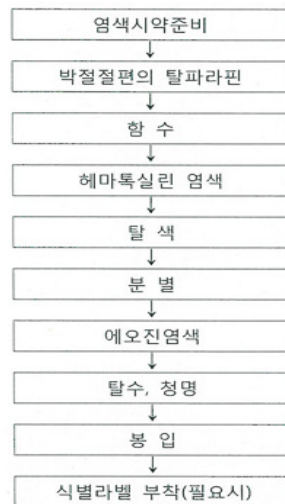
- 다) 고정된 조직은 흐르는 물로 6시간 이상 수세하여 고정액을 제거했다.
- 라) 조직전처리기(Tissue processor, Leica, Germany)를 이용, 탈수(Dehydration)-청명(Clearing)-파라핀침투(Paraffin infiltration)과정을 거쳐 포매기(Tissue embedding center, Leica, Germany)를 이용해 적당한 크기의 파라핀 블록을 만들었다.

(2) 파라핀 블록의 박절

- 가) 미세박절기(Tissue microtome, Leica, Germany)를 이용해 3 ~4 μm 의 두께로 파라핀블록을 얇게 잘라냈다.
- 나) 박절된 파라핀조각은 항온수조에 띄운 후 유리슬라이드에 올려 건조시켰다.

(3) 조직슬라이드의 염색

- 가) 자동염색봉입기(Automatic stainer, DAKO, Denmark)를 이용해 다음과 같은 절차[그림 II-11]로 현미경 검경을 위한 염색슬라이드를 제작했다. 염색에 사용된 Hematoxylin, Eosin 및 봉입제는 자동염색봉입기 전용으로 시판되는 시약을 사용하였다. (Dako hematoxylin, CS700; Dako Eosin, CS701; Dako mounting medium, CS703; DAKO, Denmark)



[그림 II-11] 염색과정의 작업 모식도

III. 연구 결과

1. 선행 연구 분석

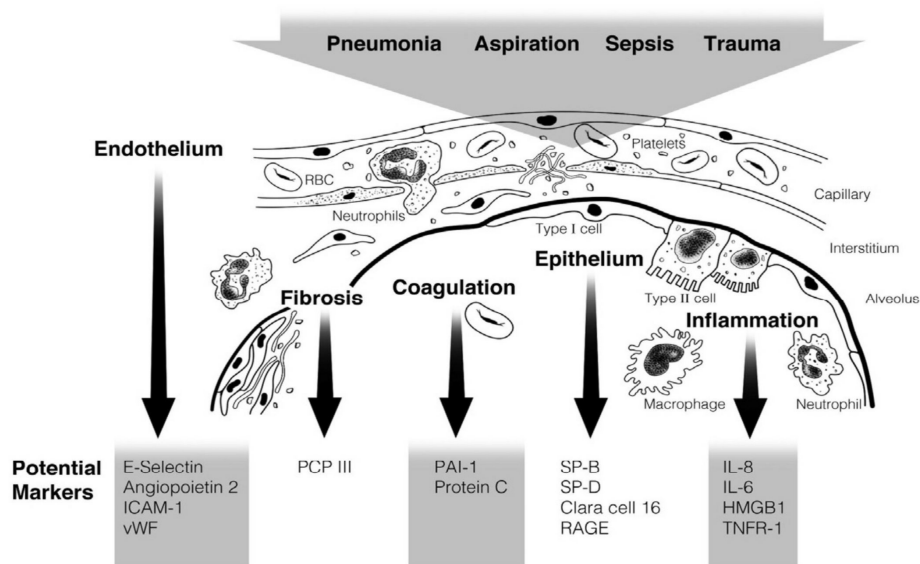
1) 장기 별 주요 독성 기전 및 생체 지표

(1) 호흡기계

가) 폐 독성의 기전

폐의 독성은 폐 세포 자체의 손상과 혈관 내피의 손상을 포함해 손상된 세포 및 이주한 염증세포에서 분비되는 여러 단백질에 의해 유발된다. 또는 여러 경로로 유입된 외부 인자 등에 의한 면역 반응도 폐 조직에 손상을 유발할 수 있다. 현재의 폐 손상 생체 지표들은 급성 폐질환(Acute lung injury, ALI; Acute respiratory distress syndrome, ARDS), 만성 질환(Chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 및 천식(Asthma) 등의 알러지성 질환(Allergic disease)등의 질병 중심으로 알려져 있다.

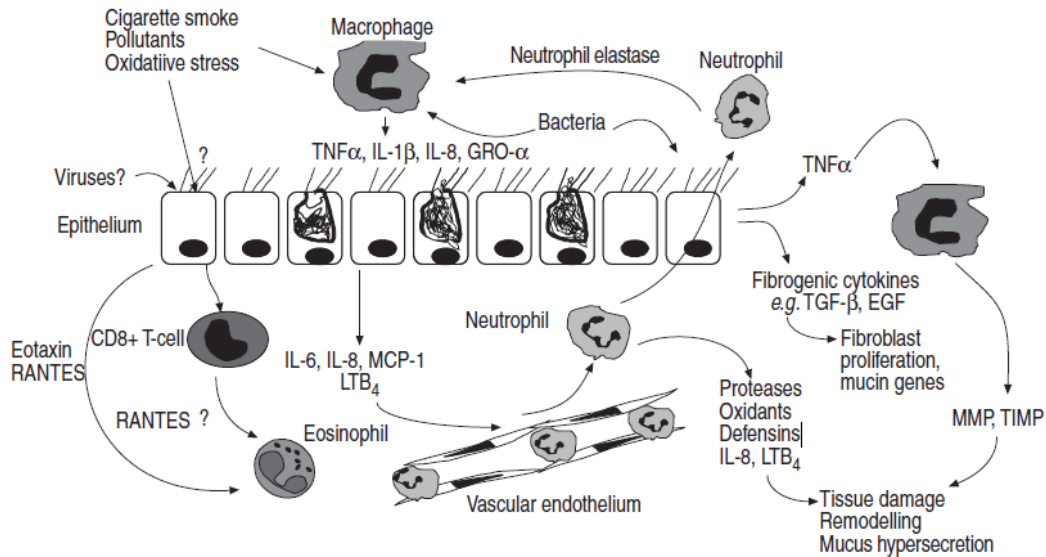
급성 폐질환은 복합적인 염증을 동반하는 증상으로 심혈관 기계와 관련이 없는 폐의 부종을 동반한다. 다양한 손상성 자극을 통해 폐포 내 단백질이 풍부한 부종성 액체, 염증 세포, 죽은 세포의 부스러기, 염증성 매개체가 저류하게 되고, 국소적 또는 전신적 증상을 유발한다. 호흡기능의 급격한 저하 등의 임상증상을 중심으로 진단되고 있으며, 주로 염증과 관련된 사이토카인의 작용을 통해 폐 조직에 손상을 유발하고 호흡 기능에 영향을 미친다. [그림 III-1]



[그림 III-1] 급성 폐 손상시 폐포와 모세혈관에 작용하는 생체 지표

(자료: Barnett et al., 2011)

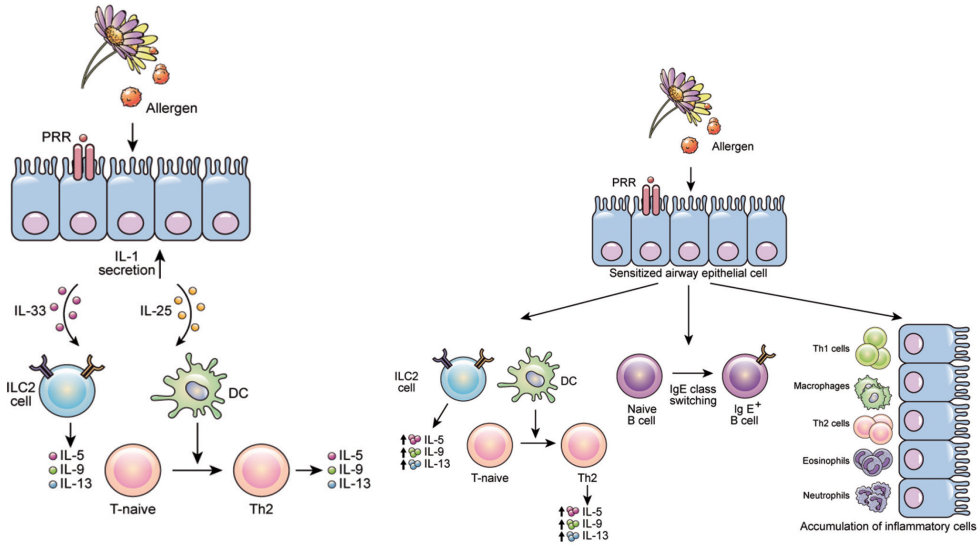
만성 폐질환은 대표적으로 만성폐쇄성폐질환(COPD)를 들 수 있으며, 비가역적인 공기 흐름의 제한을 특징으로 한다. 시간이 지남에 따라 이러한 공기 흐름의 제한은 점점 진행이 되고 유해한 미세 분자 및 가스 등에 대한 폐의 비정상적인 염증성 반응을 유도한다. 만성폐쇄성폐질환은 유전과 환경의 영향을 동시에 받는 질환으로 일련의 만성 염증의 과정으로 사이토카인 등의 영향을 받아 조직의 손상과 회복을 반복해 기관지 내 점액의 과다분비 및 호흡기계의 부분적 폐쇄를 동반한다. 염증 반응의 가장 주요한 요소는 호중구 및 세포독성 T-림프구로 분비하는 사이토카인에 따라 추가적으로 염증세포를 모으고, 자체적으로 세포에 손상을 유발하기도 한다 (Abramson et al., 20014). 만성폐쇄성폐질환에서 주로 작용하는 사이토카인의 종류와 기전을 [그림 III-2]에 나타내었다.



[그림 III-2] 만성폐쇄성폐질환의 주요 사이토카인과 연관성

(자료: Chung, 2001)

알러지성 천식은 일반적으로 원인 물질을 체내에서 인식하며 감작 (Sensitization)이 시작된다. 노출 이후 기관지 상피 세포가 원인 물질을 인지해 Th2 면역반응이 유도되고 사이토카인들이 다량 분비된다 (Moro et al., 2010). 기관지 상피 세포에 원인 물질의 지속적인 노출이 있을 경우 이러한 반응을 증가시켜 사이토카인의 급격한 증가(Barnes, 2008), B 림프구의 변화, 기관지 내 염증 세포의 증가로 이어진다 (Deckers et al., 2013). 비만세포의 탈과립에 의한 히스타민, 세로토닌 등의 방출과 프로스타글란딘 및 류코트리엔 역시 증가하며, 호산구의 증가에 의해 기관지 과민반응 및 기관지내 근육의 수축된다(Bochner and Busse, 2005). 과정이 반복되면 호흡기의 평활근을 중심으로 재구성 (Airway remodelling)이 일어나 질병을 악화시킨다(Boxall et al., 2006). 천식의 과정 별 단계별 모식도를 [그림 III-3]에 나타내었다.



[그림 III-3] 알러지성 천식의 병인 모식도

(자료: Sim and Lee, 2016)

나) 생체 지표

폐 질환은 비침습적인 방법으로 폐기능검사(폐활량 검사 및 최대호기속도 검사) 및 흉부 영상 촬영이 가장 기본적인 생체 지표로 이용되고 있다. 또한 객담 시료를 통한 생체 지표의 측정도 진행되고 있으며 표준화하는 추세이다. 그러나 혈액을 통한 생체 지표의 연구가 가장 활발하게 추진되고 있으며 혈청 섬유소원(Fibrinogen)은 미국 FDA에서 2015년 만성폐쇄성폐질환의 악화, 진행 상황 및 사망률과 관계가 있는 생체 지표로 승인받았다. 각 질환 분류 별 주요 생체 지표를 <표 III-1>에 나타내었다.

<표 III-1> 폐의 질환 별 주요 생체 지표

주요 질환	항 목	관련 문헌
급성 폐손상 (ALI)	Inflammatory cytokines : IL-2, IL-6, IL-8, I-10, IL-1ra TNF- α Soluble TNF receptor 1/2 High mobility box-1 (HMGB1) Receptor for Advanced Glycation- End Products (RAGE)	Park et al., 2001 Takala et al., 2002 Cohen et al., 2009 Fremont et al., 2010
	Selectins (Endothelial/ Leucocyte/ Platelets) Intercellular adhesion molecules(ICAM) von Willebrand factor (vWF)	Langer and Chavakis, 2009 Newman et al., 1993 Fiedler and Augustin, 2006 Franchini and Lippi, 2006
	Angioipoin-2	van Meurs et al., 2009
	Vascular endothelial growth factor (VEGF)	Medford and Millar, 2006
	Surfactant proteins (A, B, C and D)	Chroneos et al., 2010
	Clara cell protein (CC16)	Kropski et al., 2009
	Laminin-5	Katayama et al., 2010
	Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)	Calfee et al., 2009
	Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)	Prabhakaran et al., 2003
	Procollagen peptide III (PCP III)	Fremont et al., 2010
	Lipopolysaccharide binding protein (LBP)	Dentener et al., 2000
만성 폐손상 (COPD)	Fibrinogen	Hurst et al., 2010
	C-reactive protein (CRP)	Kaptoge et al., 2010
	Serum amyloid protein (SAA)	Kaptoge et al., 2010
	Receptor for advanced glycation- end product (RAGE) Advanced glycation end product (AGE)	Ware et al., 2013
	Surfactant protein D (SP-D)	Hartl and Griesse, 2006
	Clara cell 16 (CC-16)	Lomas et al., 2008
	Pulmonary and activation regulated chemokine (PARC, CCL-18)	Lock-Johansson et al., 2014
	IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-18	Robinson et al., 1992
	Tumour necrosis factor alpha (TNF- α) Growth-related oncogene(GRO)- α Epithelial-derived neutrophil Activator-78 (ENA-78,)	Celli et al., 2012 Khair et al., 1994 Walz et al., 1987 Morrison et al., 1998
	Regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted (RANTES) Monocyte chemotactic protein-4 (MCP-4) Granulocyte colony-stimulating factor	Kelner et al., 1994 Lord et al., 1989 de Haas et al., 1994 Khwaja et al., 1992

주요 질환	항 목	관련 문헌
	(G-CSF) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)	
	Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) Macrophage inflammatory protein 1 α (MIP-1 α)	Kelner et al., 1994 Masubuchi et al., 1998
	IL-16(CD4+), MIP-1 α (CD8+), Stimulated T-cell chemoattractant protein (STCP-1)	Kelner et al., 1994 Andrew et al., 1998
	Interferon gamma (IFN- γ)	Kumar et al., 2006
	Cytokines (Growth factors) : Transforming growth factor- β (TGF- β) Platelet-derived growth factor (PDGF) Epidermal growth factor (EGF) Insulin-like growth factor (IGF)	Brewster et al., 1990 Hirst et al., 1992 Vignola et al., 1997 Takeyama et al., 1999
천식 (Asthma)	Serum Immunoglobulin E (IgE)	Simpson et al., 2005
	Eosinophils (Peripheral blood/Sputum)	Druilhe et al., 2003 Kips et al., 1998
	Periostin	Woodruff et al., 2007
	Human chitinase-3 like protein 1 (YKL-40)	Konradsen et al., 2013
	IL-4, IL-5, IL-9, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, IL-25, IFN- γ	Barczyk et al., 2006 Stirling et al., 2001 Trinchieri et al., 2003 Wills-Karp, 2004 Dragon et al., 2007 Dinarello, 2007 Fort et al., 2001
	IL-1 β IL-6 TNF- α Thymic stromal lymphopoietin (TSLP)	Rosenwasser, 1998 Kips et al., 1993 Allakhverdi et al., 2007
	Epidermal growth factor (EGF) GM-CSF Nerve growth factor (NGF) Stem cell factor (SCF) TGF- β Vascular endothelial growth factor (VEGF)	Takeyama et al., 2001 Gajewska et al., 2003 Nassenstein et al., 2006 Reber et al., 2006 Minshall et al., 1997 Feltis et al., 2006
	Eotaxin-2 and 3	Ravensberg et al., 2005
	IL-10	Hawrylowicz, 2005

(자료 : Barnett, 2011; Chung, 2001; Sim and Lee, 2016)

(2) 간·담관계

가) 간독성의 원인

간독성은 크게 간세포 자체의 손상과 담관계통의 손상의 두가지 범주로 나뉘어진다. 이러한 손상들의 형태학적 특성은 매우 다양하고 종종 두가지 범주가 혼합된 독성이 관찰되기도 한다(Hardisty and Brix 2005). 주로 알려진 간독성의 원인들은 cytochrome P45에 의한 약물의 공유적 결합, 지방산의 β -oxidation에 연관된 미토콘드리아의 기능 변화, 활성 산소 및 대사산물의 생성, 운송 단백질의 변화, 세포 내 미세섬유의 변화, 칼슘 이온의 항상성 유지 방해, 림프구의 활성화와 세포.용해, 단일세포 괴사 등이 알려져 있다(Lee 2003).

나) 생체 지표

일반적으로 알려져 있는 약물에 의한 간 손상의 생체 지표는 알라닌아미노기전이효소(ALT)와 아스파탐산아미노기전이효소(AST)이다. 그러나 특이성과 민감성이 크지 않고, 조직병리학적 병변과의 연관성이 떨어지는 단점이 있기 때문에 다양한 연구자들이 유용하게 적용될 수 있는 간 특이적 생체 지표를 탐색하고 국제적 합의(International Harmonization of Clinical Pathology Testing, IHCTP)를 거쳐 다음의 <표 III-2>와 같은 생체 지표들을 제시하고 있다 (Boone et al., 2005).

<표 III-2> 간 특이적 생체 지표의 종류 (IHCTP 기준)

Category	Tests
Hepatocellular tests	Alanine aminotransferase (ALT)
	Aspartate aminotransferase (AST)
	Sorbitol dehydrogenase (SDH)
	Glutamate dehydrogenase (GLDH)
	Total bile acid
Hepatobiliary test	Alkaline phosphatase (ALP)
	Gamma glutamyl transferase (GGT)
	5'-nucleotidase(5'-NT)
	Total bilirubin
	Total bile acids

또한 위의 생체 지표들과 더불어 새롭게 다양한 종류의 생체 지표들이 탐색되고 있다. 효소로는 ALT, ALP, GGT, GLDH, SDH, LDH, Urea cycle enzymes(Ornithine carbamoyl transferase, OCT and arginase), 5'-NT, Leucine Aminopeptidase(LAP), Alpha-glutathione S-transferase (Alpha-GST), cholinesterase 및 paraoxanase 등이 알려져 있다. 지질은 간기능 중 콜레스테롤 합성에 문제가 있을 때 주요 마커로 이용될 수 있으며, 종류로는 cholesterol, low density and very low density lipoprotein(LDL and VLDL) 및 Liver fatty acid binding protein (L-FABP)등이 알려져 있다. 기타 종류로 Taurine 및 Creatine, 조직 내 Glutathione, 조직 내 Microsomal P450 등이 있다. 최근 대두되고 있는 간독성의 특이적 생체 지표들을 <표III-3>에 정리하였다.

<표 III-3> 간의 대표적 생체 지표의 종류와 기능

범 위	종 류	기 능	관련 문헌
Enzyme	ALP GGT	간실질보다 담관계통의 손상에 민감	Rutgers et al., 1995 Evans 1986
	ALT SDH	세포 독성에 민감, 간특이적	Amacher et al., 1998
	LDH	세포 독성에 민감하나 다양한 장기와 연관됨	Zimmerman. 1982
	Cholinesterases Paraoxanase	혈청 내 활동 저하	Ferre et al., 2002
Lipids	L-FABP	단백질 운송	Glatz and van der Vusse. 1996
	LDL, VLDL	콜레스테롤 합성 증가	Evans. 2009
Others	Taurine	단백질 합성과 연관	Maxuitenko et al. 1997
	Creatine	perturbation of cysteine and glutathione metabolism	Clayton et al., 2003

범 위	종 류	기 능	관련 문헌
	Cytochrome P450	조직 내 microsome을 이용한 방법으로 간의 병리학적 소견과 밀접	Amacher et al., 2001
	Procollagen III YKL-40 Hyaluronic acid	간섬유화의 마커로 사용되나 실험동물에서 제한	Ding et al., 2001 Mardini and Record 2005
	Lipid peroxides aldehydes Malondialdehyde 4-hydroxynonenal isoprostane	Oxidative phosphorylation 및 redox와 연관, 미토콘드리아의 기능이상	Otsyula et al. 2003 Berdanier 2005
	Ketone body ratio (acetoacetate/3-hydroxybutyrate)	간의 에너지 생산 및 손상 변화에 민감, 케톤뇨증과 연관	Laun et al., 2001 Matsumoto et al., 2005

(자료 : Evans, 2009)

(3) 비뇨기계

가) 신장 독성의 원인

신장 독성은 신장을 구성하는 조직 세포 자체의 독성, 기능적 이상 특히 세뇨관의 기능 이상, 소변의 배출 이상 및 전해질 불균형 등으로 구별될 수 있으며, 신장 기능이 상실될수록 심장 또는 간에 큰 영향을 미치게 된다. 신장은 배설 및 외부 물질의 해독에 중요한 역할을 하며 다량의 혈류 흐름과 농축 기능으로 인해 체내의 독성 물질(대사 산물 포함)에 노출될 위험이 큰 장기중 하나이다(Tarloff and Lash 2004).

나) 생체 지표

신장의 기능 이상을 나타내는 생체 지표들은 소변에서 다량 또는 특이적으로 배출되는 경우가 많아(세뇨관의 손상 등) 혈액 및 소변 모두에서 시료를 채취한다. 일반적으로 이용되는 생체 지표를 <표 III-4>에 정리했다.

<표 III-4> 신장 특이적 생체 지표의 종류

Category	Tests
Blood	Creatinine
	Blod urea nitrogen(BUN)
Urinalysis	Abnormal color and appearance, Volume
	Relative concentration/density (osmolality or specific gravity)
	Protein, Glucose, Blood, pH
	Microscopy of urine sediment

또한, 위의 마커들 외에 소변으로 배출되는 효소 및 단백질도 직접적으로 손상의 지표로 이용 될 수 있다. 각 효소마다 신장 조직 내 및 세포 내 존재위치가 다르기 때문에 위치별 독성 탐색이 가능하다. 실험적으로 제시된 소변 내 효소 및 단백질 생체 지표들에 대해 <표 III-5>에 제시하였다.

<표 III-5> 실험적 신장 특이 생체 지표의 종류

종 류	위 치	항 목	관 련 문 헌
효 소	세포질 내 (Cytosolic enzyme)	Lactate dehydrogenase (LDH)	Raab 1998
	근위 세뇨관 솔기 가장자리 (Proximal tubular brush border enzyme)	Alanine aminopeptidase (AAP) Leucine arylamidase γlutamyl transferase (GGT) αglutathione S-transferase (YaYc GST)	Taracha et al., 2004 Usuda et al., 1999 Dote et al., 2000 Walshe et al., 2009
	원위 세뇨관 (Distal tubular enzyme)	γglutathione S-transferase (Yb1, GST)	Shu et al., 2016
	리소좀 내 Lysosomal enzyme	N-acetyl-beta-glucosaminidase (NAG)	Stonard et al., 1987
단백질		Renal papillary antigen 1 (RPA-1) Kidney injury molecule 1 (Kim-1) Clusterin Neutrophil gelatinase- associated lipocalin (NGal)	Han et al., 2002 Eti et al., 1993 Devarajan. 2008

(자료 : Evans, 2009)

2) 생체 지표 분석에 사용되는 주요 시료의 종류 및 장단점

(1) 조직 검체 (Tissue)

DNA를 포함한 유전체의 분석에 유용한 시료로 염색체 검사(Chromosomal test), 유전자 검사(Gene test) 등을 수행하기에 용이하다. 소량의 세포만으로 수행 가능하나 내부 장기의 조직이 필요할 경우 비침습적 방법을 수행할 수 없는 단점이 있다.

(2) 혈액 (Blood)

가장 보편적으로 사용되는 시료로 혈액 자체를 사용하기보다 혈장 및 혈청 분리의 형태로 주로 이용된다. 대부분의 사이토카인 등의 단백질, 효소 등이 존재하며 다량의 시료를 확보할 수 있는 장점이 있다. 그러나 특정 조직 검체에 비해 전반적인 농도가 낮게 나타날 수 있으며, 혈액 응고 과정에 연관된 생체 지표는 탐색이 어려운 단점이 있다. 특정 종양 탐색의 경우 혈액내 부유하는 종양DNA (Circulating tumor DNA, CtDNA) 또는 순환종양세포(Circulation tumor cell, CTC)가 이용되기도 한다. 또한 혈액내 미소낭포(Extracellular vesicle) 및 엑소좀(Exosome)도 생체 지표로서 연구되고 있다. 대부분의 동물 세포에서 배출되고, 대사질환의 각 단계별 상태 반영이 가능할 것으로 여겨지고 있지만 현재까지 채취 및 측정이 용이하지 않아 추가적인 연구가 필요하다.

(3) 기타 체액 (Other body fluids)

소변, 침, 뇌척수액, 기관지폐세척액, 눈물 등이 사용될 수 있다. 주로 사용되는 것은 소변 및 타액으로 샘플의 취급이 용이한 장점이 있다(Bock et al., 2010). 소변의 경우 신장과 관련된 생체 지표가 주로 연구되고 있으나 신장의 기능에 따라 단백질 및 염 등의 농도 변동이 큰 단점이 있다. 뇌척수액은 신경계통의 생체 지표와 밀접한 연관이 있으며 기관지폐세척액은 동물 실험에서도 주로 사용될 수 있는 시료로 높은 농도의 호흡기 특이적 생체 지표의 진단이

가능하다. 액체 또는 기체 상태의 시료 분석에 이용되는 고분자용 질량분석기 (Time of flight mass spectrometry, TOF-MS)를 위한 주요 체액 및 혈액 시료의 장·단점을 <표 III-6>에 나타내었다.

<표 III-6> 생체 지표의 분석을 위한 시료의 종류 및 장·단점

Body fluids	Advantages	Limitations	Recommendations
Serum	(i) established sample banks often composed of serum aliquots (retrospective studies), (ii) proteins and peptides that "survive" to the clotting procedure exhibit a stability that can be exploited in routine clinical applications.	(i) presence of various products derived from coagulation cascade, (ii) biomarker with poor stability during coagulation process will not be detected in serum, (iii) possible influence of the disease on coagulation process.	(i) use standardized collection protocol, (ii) keep sample during 1hour at RT to allow clotting process before centrifugation, (iii) preserve on ice after clotting. Aliquoting and freezing (-80°C) cannot be done immediately.
Plasma	(i) more rapidly processed than serum (interesting for emergency diagnosis), (ii) larger final volume of fluid after processing than with serum, (iii) more stable than serum due to the inhibition of coagulation cascade.	(i) interference with chip surface (i.e. heparin tube), (ii) sample dilution in citrate tube, (iii) possible interference of EDTA with protein binding on IMAC surface,	(i) use standardized collection protocol, (ii) carefully choose the type of anticoagulants(EDTA tubes are preferable), (iii) use platelet-poor plasma, (iv) centrifuge, aliquot and freeze (-80°C) as soon as possible. If not possible, keep at RT to avoid cold platelet activation.
Dry blood	(i) medical staff not needed for collection, (ii) low blood volume necessary, (iii) easy storage and transport.	(i) elution step to recover sample from filter paper	(i) keep dry specimens at RT for 3 - 4 hours in horizontal position, (ii) store at -20°C.

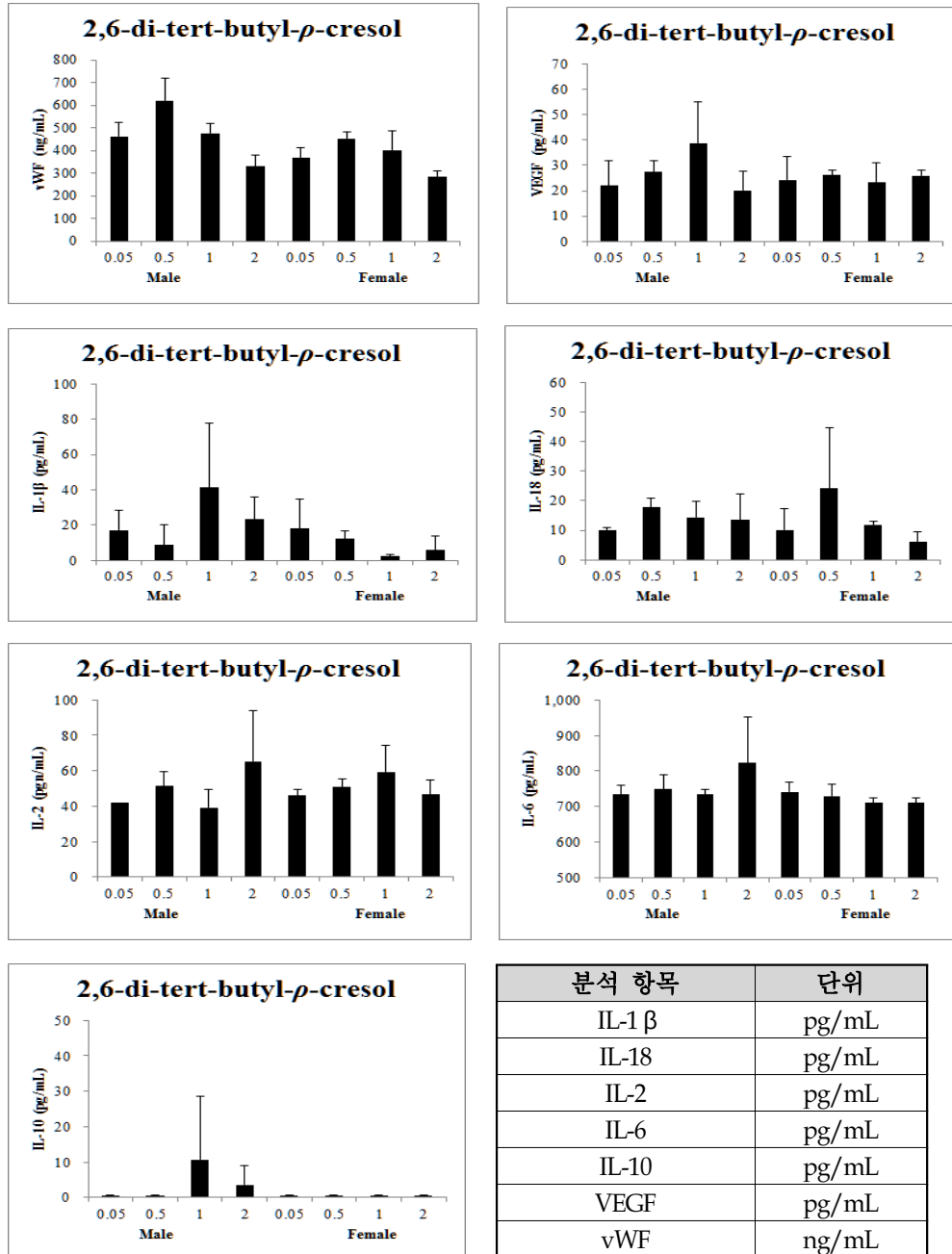
Body fluids	Advantages	Limitations	Recommendations
Saliva	(i) easy and noninvasive sampling, (ii) medical staff not needed for collection	(i) low volume collected, (ii) presence of many proteases and unspecific materials such as food residues or microorganisms, (iii) level of certain plasma proteins are not reflected in saliva.	(i) always collect with the same method (stimulated or not) and at the same moment of the day, (ii) centrifuge to remove insoluble material, aliquot and freeze at -80°C .
Urine	(i) easy and noninvasive collection, (ii) medical staff not needed for collection, (iii) obtained in large volume.	(i) fluctuation of protein concentration overtime and according to renal integrity, (ii) presence of salts and proteins in low concentration.	(i) use standardized collection protocol, (ii) concentrate the samples, (iii) centrifuge, aliquot and freeze at -80°C , (iv) normalization with creatinine content.

(자료: Bock et al., 2010)

2. 시료 분석 결과

1) 랫드를 이용한 급성흡입독성시험

2,6,-디-삼차-부틸-파라-크레졸을 급성(단회) 흡입 노출시킨 암수 SD 랫드를 이용해(노출농도: 0.05, 0.5, 1, 2 mg/L) 혈액 시료 중 혈청을 분리해 생체 지표들에 대해 분석한 결과를 [그림 III-4]로 나타내었다.



[그림 III-4] 2,6-디-삼차-부틸-파라-크레졸을 이용한 급성 흡입시험의 동물 혈액 시료 내 생체 지표 분석

2) 랫드를 이용한 아급성 흡입독성시험

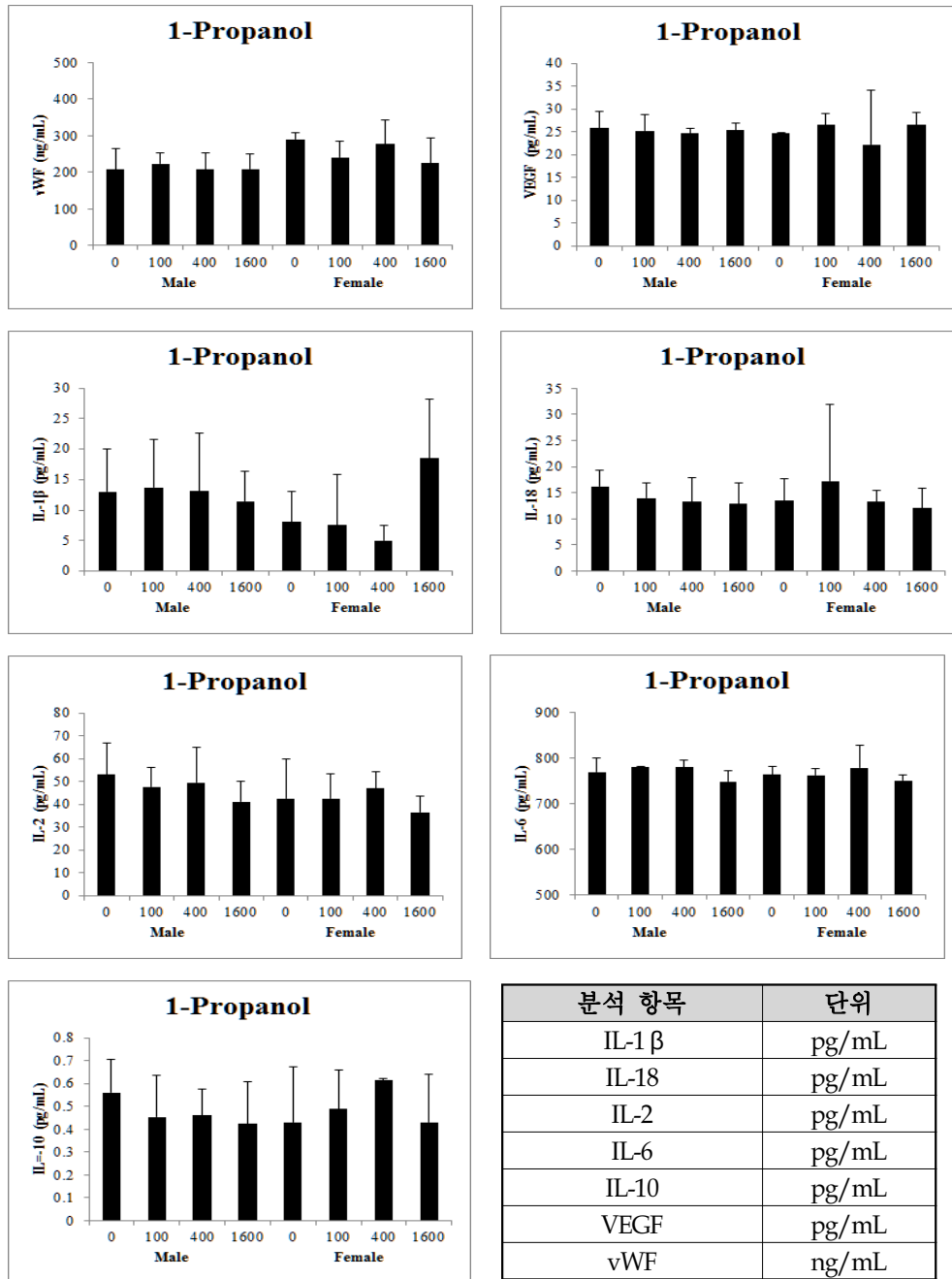
노말 프로필 알콜을 아급성(28일) 흡입 노출시킨 암수 F344 랫드를 이용해 (노출농도: 0, 100, 400, 1600 ppm) 혈액 시료 중 혈청을 분리해 혈액생화학적 검사를 포함한 생체 지표들에 대해 분석한 결과를 <표 III-7> 및 [그림 III-5]로 나타내었다.

<표 III-7> 노말 프로필 알콜을 이용한 아급성 흡입시험의 혈액생화학적 분석 결과

Male												
Parameters	Control			T1			T2			T3		
	(0 ppm)			(100 ppm)			(400 ppm)			(1600 ppm)		
CA(mg/dL)	9.6	±	0.3	9.5	±	0.2	9.4	±	0.2	9.4	±	0.3
IP(mg/dL)	7.3	±	0.7	6.9	±	0.7	6.6	±	0.9	6.7	±	1.1
ALP(IU/L)	736.7	±	34.6	679.9	±	34.6	620.0	±	38.9*	726.9	±	83.8
ALT(GPT)(IU/L)	35.2	±	2.2	37.3	±	2.2	36.6	±	1.5	36.5	±	1.6
AST(GOT)(IU/L)	77.6	±	7.6	77.2	±	7.6	79.7	±	4.1	81.4	±	9.1
TG(mg/dL)	56.4	±	14.4	71.0	±	21.7	55.3	±	10.3	66.5	±	26.2
TCHO(mg/dL)	59.8	±	1.6	78.6	±	11.8*	75.3	±	10.1*	69.6	±	11.2
TBIL(mg/dL)	0.16	±	0.02	0.16	±	0.02	0.15	±	0.01	0.15	±	0.01
GLU(mg/dL)	137.6	±	6.0	139.9	±	14.4	127.1	±	11.8	135.7	±	8.2
CREA(mg/dL)	0.38	±	0.03	0.38	±	0.02	0.40	±	0.03	0.39	±	0.01
BUN(mg/dL)	20.3	±	2.6	20.3	±	1.5	20.1	±	1.6	21.0	±	2.6
ALB(g/dL)	4.1	±	0.0	4.0	±	0.1	4.1	±	0.1	4.1	±	0.1
TP(g/dL)	5.7	±	0.0	5.6	±	0.1	5.7	±	0.3	5.8	±	0.1
Cl(mmol/L)	97.9	±	0.6	100.0	±	1.1	100.6	±	1.4*	101.2	±	0.8*
K(mmol/L)	4.16	±	0.69	4.64	±	0.25	4.61	±	0.25	4.74	±	0.18
Na(mmol/L)	140.5	±	4.0	146.2	±	1.2	147.0	±	1.0*	146.7	±	0.4*
CK(U/L)	325.8	±	112.6	299.2	±	151.0	337.6	±	104.1	366.9	±	175.2
GLO(g/dL)	1.6	±	0.0	1.6	±	0.1	1.6	±	0.2	1.7	±	0.1

Female												
Parameters	Control (0 ppm)			T1 (100 ppm)			T2 (400 ppm)			T3 (1600 ppm)		
CA(mg/dL)	9.2	±	0.2	9.3	±	0.3	9.1	±	0.1	9.4	±	0.6
IP(mg/dL)	6.9	±	0.2	7.1	±	0.6	6.7	±	0.4	7.5	±	1.2
ALP(IU/L)	543.1	±	12.2	530.2	±	20.4	519.8	±	31.2	506.6	±	38.7
ALT(GPT)(IU/L)	38.2	±	4.1	40.1	±	6.2	33.7	±	2.5	40.9	±	5.0
AST(GOT)(IU/L)	96.0	±	19.2	90.9	±	10.2	85.9	±	7.6	103.8	±	36.0
TG(mg/dL)	14.6	±	4.0	18.2	±	2.8	11.1	±	0.5	13.3	±	6.2
TCHO(mg/dL)	70.6	±	3.6	70.1	±	4.0	64.1	±	11.9	68.7	±	6.1
TBIL(mg/dL)	0.15	±	0.01	0.15	±	0.01	0.16	±	0.02	0.12	±	0.07
GLU(mg/dL)	100.0	±	11.4	114.8	±	31.0	95.1	±	17.8	98.2	±	21.0
CREA(mg/dL)	0.37	±	0.02	0.37	±	0.02	0.39	±	0.02	0.37	±	0.04
BUN(mg/dL)	20.4	±	3.1	18.8	±	1.4	20.0	±	3.7	22.1	±	1.7
ALB(g/dL)	4.0	±	0.1	4.0	±	0.1	4.1	±	0.1	4.2	±	0.1
TP(g/dL)	5.5	±	0.2	5.5	±	0.2	5.7	±	0.1	6.8	±	1.9
Cl(mmol/L)	102.0	±	0.7	102.7	±	0.7	102.6	±	0.5	103.0	±	0.9
K(mmol/L)	4.50	±	0.11	4.45	±	0.13	3.96	±	0.30*	4.58	±	1.13
Na(mmol/L)	146.0	±	1.6	147.3	±	0.9	147.4	±	0.6	146.7	±	1.13
CK(U/L)	377.3	±	161.3	281.8	±	129.3	286.3	±	109.5	463.2	±	353.2
GLO(g/dL)	1.5	±	0.2	1.5	±	0.1	1.6	±	0.2	2.6	±	1.9

All values are expressed as mean ± SD. Significant differences as compared with control : * p < 0.05.
 CA, Calcium; IP, Inorganic phosphorus; ALP, alkaline phosphatase; ALT(GPT), alanine aminotransferase;
 AST(GOT), aspartate aminotransferase; TG, Triglyceride; TCHO, total cholesterol; TBIL, total bilirubin;
 GLU, glucose; CREA, Creatinine; BUN, blood urea nitrogen; ALB, albumin; TP, total protein; Cl,
 Chloride; K, Potassium; Na, Sodium; CK, Creatine phosphokinase; GLO, globulin;



[그림 III-5] 노말 프로필 알코올을 이용한 아급성 흡입시험의 동물 혈액 시료 내 생체 지표 분석

3) 랫드를 이용한 아만성 흡입독성시험

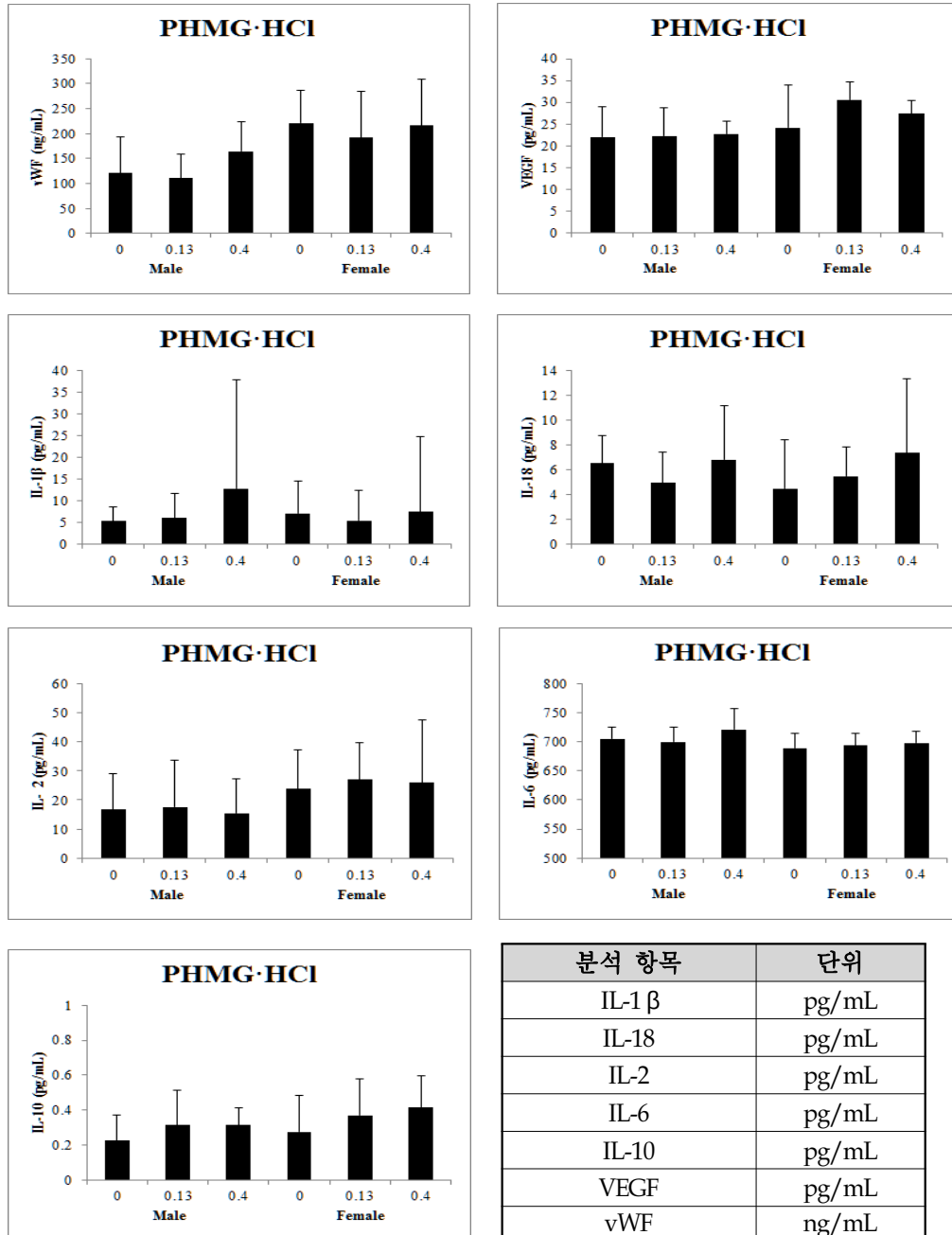
폴리헥사메틸렌구아니딘 염산염을 아급성(90일) 흡입 노출시킨 암수 F344 랫드를 이용해 (노출농도 : 0, 0.13, 0.4 ppm) 혈액 시료 중 혈청을 분리해 혈액생화학적 검사를 포함한 생체 지표들에 대해 분석한 결과를 <표 III-8> 및 [그림 III-6]로 나타내었다.

<표 III-8> 폴리헥사메틸렌구아니딘 염산염을 이용한 아만성 흡입시험의 혈액생화학적 분석 결과

Male												
Parameters	Control (0 ppm)			T1 (0,13 ppm)			T2 (0.4 ppm)			T3 (1.20 ppm)		
CA(mg/dL)	10.1	±	0.2	10.1	±	0.2	9.9	±	0.3	10.1	±	0.2
IP(mg/dL)	5.4	±	0.8	5.2	±	1.0	5.2	±	1.1	4.5	±	0.4
CPK(IU/L)	175.3	±	96.1	179.7	±	82.2	198.2	±	96.3	323.1	±	70.6
ALP(IU/L)	473.8	±	46.5	465.6	±	34.6	444.8	±	26.2	910.3	±	107.5
GPT	0.29	±	0.90	0.07	±	0.16	0.32	±	0.54	1.63	±	0.78
ALT(GPT)(IU/L)	49.7	±	6.0	47.7	±	4.7	50.1	±	8.0	225.0	±	211.4
AST(GOT)(IU/L)	81.6	±	8.8	83.3	±	10.0	88.9	±	11.2	186.6	±	120.1
TG(mg/dL)	146.1	±	41.6	128.0	±	29.2	118.5	±	23.0	71.4	±	33.8
TCHO(mg/dL)	76.5	±	9.0	78.2	±	7.1	74.0	±	5.5	103.2	±	8.2
TBIL(mg/dL)	0.11	±	0.01	0.11	±	0.01	0.11	±	0.02	0.10	±	0.04
GLUS(mg/dL)	175.8	±	17.1	175.4	±	13.5	162.5	±	12.5	149.0	±	17.3
CREA(mg/dL)	0.46	±	0.04	0.45	±	0.04	0.46	±	0.05	0.40	±	0.02
BUN(mg/dL)	19.3	±	1.3	19.1	±	1.5	20.2	±	1.8	20.8	±	2.3
ALB(g/dL)	4.3	±	0.1	4.3	±	0.1	4.2	±	0.1	3.9	±	0.1
TP(g/dL)	6.5	±	0.2	6.5	±	0.1	6.5	±	0.1	6.1	±	0.2
Cl(mmol/L)	78.0	±	0.9	78.6	±	0.7	79.4	±	0.8	102.5	±	1.4
K(mmol/L)	3.50	±	0.30	3.51	±	0.28	3.70	±	0.30	5.52	±	0.29
Na(mmol/L)	109.9	±	0.8	110.0	±	0.6	110.7	±	0.4	145.4	±	1.6
LDH	521.0	±	352.2	577.7	±	288.9	681.7	±	387.7	1339.9	±	269.4

Female												
Parameters	Control (0 ppm)			T1 (0.13 ppm)			T2 (0.4 ppm)			T3 (1.20 ppm)		
CA(mg/dL)	10.1	±	0.3	10.0	±	0.2	10.1	±	0.3	10.4	±	0.4
IP(mg/dL)	5.0	±	1.2	4.8	±	1.1	5.0	±	1.2	5.5	±	0.8
CPK(IU/L)	177.6	±	44.4	177.4	±	77.3	143.4	±	55.8	149.2	±	11.6
ALP(IU/L)	360.2	±	32.1	359.0	±	36.5	381.8	±	27.3	912.9	±	154.4
GPT	0.11	±	0.24	0.04	±	0.09	0.15	±	0.28	2.64	±	0.82
ALT(GPT)(IU/L)	39.7	±	9.7	38.4	±	11.4	39.5	±	8.3	94.1	±	46.6
AST(GOT)(IU/L)	86.0	±	18.3	80.1	±	17.7	81.0	±	10.4	116.3	±	34.2
TG(mg/dL)	27.7	±	6.9	36.5	±	13.1	29.6	±	17.9	31.2	±	10.4
TCHO(mg/dL)	100.8	±	10.1	104.3	±	5.3	98.3	±	7.8	103.8	±	13.8
TBIL(mg/dL)	0.11	±	0.04	0.12	±	0.02	0.13	±	0.02	0.09	±	0.02
GLUS(mg/dL)	130.0	±	10.7	130.8	±	20.2	133.7	±	19.3	149.5	±	8.0
CREA(mg/dL)	0.47	±	0.02	0.47	±	0.03	0.49	±	0.04	0.39	±	0.03
BUN(mg/dL)	22.2	±	3.1	21.9	±	2.2	23.2	±	2.2	23.2	±	2.8
ALB(g/dL)	4.5	±	0.2	4.5	±	0.1	4.3	±	0.1	3.8	±	0.1
TP(g/dL)	6.9	±	0.4	6.9	±	0.1	6.6	±	0.2	5.9	±	0.2
Cl(mmol/L)	80.9	±	1.0	81.2	±	0.6	81.3	±	0.8	104.8	±	1.1
K(mmol/L)	3.12	±	0.33	3.18	±	0.23	3.19	±	0.24	4.82	±	0.40
Na(mmol/L)	111.7	±	0.8	111.2	±	0.8	112.0	±	1.2	148.4	±	2.2
LDH	651.7	±	185.7	671.4	±	290.4	549.5	±	255.4	643.4	±	100.3

All values are expressed as mean ± SD. CA, Calcium; IP, Inorganic phosphorus; ALP, alkaline phosphatase; ALT(GPT), alanine aminotransferase; AST(GOT), aspartate aminotransferase; TG, Triglyceride; TCHO, total cholesterol; TBIL, total bilirubin; GLUS, glucose; CREA, Creatinine; BUN, blood urea nitrogen; ALB, albumin; TP, total protein; Cl, Chloride; K, Potassium; Na, Sodium; CK, Creatine phosphokinase; GLO, globulin;



[그림 III-6] 폴리헥사메틸렌구아니딘 염산염을 이용한 아만성 흡입시험의 동물 혈액 치료내 생체 지표 분석

4) 랫드를 이용한 만성 흡입독성시험

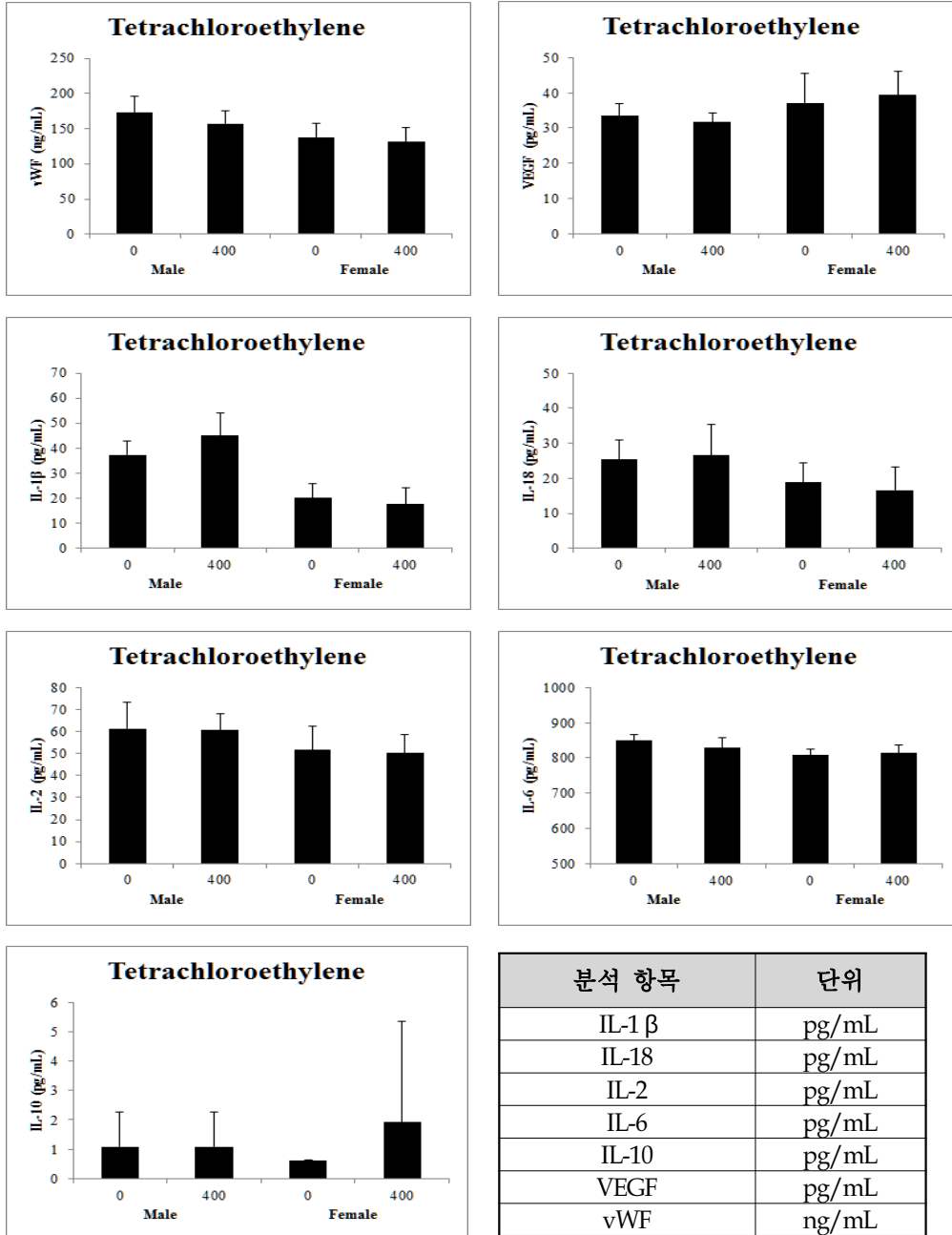
테트라클로로에틸렌을 만성(1년) 흡입 노출시킨 암수 F344 랫드를 이용해 (노출농도: 0, 400 ppm) 혈액 시료에서 혈청을 분리하여 혈액생화학적 검사를 포함한 생체 지표들에 대해 분석한 결과를 <표 III-9> 및 [그림 III-7]로 나타내었다.

<표 III-9> 테트라클로로에틸렌을 이용한 만성 흡입시험의 혈액생화학적 분석 결과

Male						
Parameters	G1 (0 ppm)			G2 (400 ppm)		
CA(mg/dL)	10.0	±	0.2	9.9	±	0.2
IP(mg/dL)	4.5	±	0.8	5.0	±	0.5
CPK(IU/L)	246.8	±	95.1	286.9	±	132.9
ALP(IU/L)	323.4	±	29.9	329.9	±	50.3
ALT(GPT)(IU/L)	117.8	±	38.8	134.9	±	44.5
AST(GOT)(IU/L)	167.4	±	39.4	169.8	±	47.3
TG(mg/dL)	135.1	±	47.6	66.5	±	28.9
TCHO(mg/dL)	127.3	±	15.0	115.1	±	13.1
TBIL(mg/dL)	0.2	±	0.0	0.18	±	0.03
GLUS(mg/dL)	178.8	±	26.3	154.2	±	23.1
CREA(mg/dL)	0.45	±	0.03	0.46	±	0.05
BUN(mg/dL)	18.7	±	1.6	17.9	±	1.7
ALB(g/dL)	4.2	±	0.1	4.2	±	0.1
TP(g/dL)	6.5	±	0.2	6.4	±	0.2
Cl(mmol/L)	103.7	±	0.9	104.1	±	0.9
K(mmol/L)	4.33	±	0.25	4.39	±	0.22
Na(mmol/L)	143.1	±	0.7	144.4	±	1.0
GGT(IU/L)	1.66	±	0.71	2.03	±	1.73
GLO(mg/dL)	2.36	±	0.09	2.25	±	0.11

Female						
Parameters	G1 (0 ppm)			G2 (400 ppm)		
CA(mg/dL)	10.3	±	0.3	10.3	±	0.3
IP(mg/dL)	4.1	±	1.0	4.2	±	0.7
CPK(IU/L)	202.9	±	146.2	167.6	±	70.5
ALP(IU/L)	203.2	±	32.9	176.0	±	29.5
ALT(GPT)(IU/L)	73.1	±	22.7	71.3	±	27.5
AST(GOT)(IU/L)	153.1	±	60.2	126.2	±	58.0
TG(mg/dL)	49.4	±	15.8	33.6	±	9.3
TCHO(mg/dL)	140.2	±	12.7	127.2	±	14.8
TBIL(mg/dL)	0.14	±	0.04	0.14	±	0.02
GLUS(mg/dL)	161.2	±	10.2	145.9	±	15.4
CREA(mg/dL)	0.47	±	0.04	0.46	±	0.04
BUN(mg/dL)	21.9	±	2.3	23.5	±	3.4
ALB(g/dL)	4.8	±	0.2	4.9	±	0.3
TP(g/dL)	7.5	±	0.4	7.5	±	0.4
Cl(mmol/L)	104.1	±	1.4	104.6	±	1.3
K(mmol/L)	4.00	±	0.36	4.06	±	0.28
Na(mmol/L)	142.5	±	1.1	143.5	±	0.8
GGT(IU/L)	1.19	±	0.49	1.34	±	1.16
GLO(mg/dL)	2.70	±	0.17	2.58	±	0.15

All values are expressed as mean $\pm$ SD. CA, Calcium; IP, Inorganic phosphorus; ALP, alkaline phosphatase; ALT(GPT), alanine aminotransferase; AST(GOT), aspartate aminotransferase; TG, Triglyceride; TCHO, total cholesterol; TBIL, total bilirubin; GLUS, glucose; CREA, Creatinine; BUN, blood urea nitrogen; ALB, albumin; TP, total protein; Cl, Chloride; K, Potassium; Na, Sodium; CK, Creatine phosphokinase; GLO, globulin;



[그림 III-7] 테트라클로로에틸렌을 이용한 만성 흡입시험의 동물 혈액 시료내 생체 지표 분석

3. 조직병리학적 검사 결과

1) 랫드를 이용한 급성 흡입독성시험

2,6,-디-삼차-파라-크레졸을 4시간동안 급성(단회) 흡입노출시킨 SD 랫의 부검시 육안소견은 발견되지 않았다. 10% 중성포르말린에 고정된 폐조직에서 시험물질에 의한 병변은 관찰되지 않았다.

2) 랫드를 이용한 아급성 흡입독성시험

노말 프로필 알콜을 28일(주 5일/4주) 동안 아급성 흡입노출시킨 F344 랫의 부검시 육안소견은 발견되지 않았다. 10% 중성포르말린에 고정된 채취 조직에서 시험물질에 의한 병변은 관찰되지 않았다.

3) 랫드를 이용한 아만성 흡입독성시험

폴리헥사메틸렌구아니딘 염산염을 90일(주 5일/13주) 동안 아만성 흡입노출시킨 F344 랫의 부검시 폐, 간, 신장, 생식기 등에서 육안 소견이 관찰되었다. 또한 조직병리학적 검사를 실시한 결과, 호흡기, 림프조직, 간, 비장, 흉선, 생식기에서 비정상 병변이 관찰되었다. 특히 암수 모두 폐에서 화생(Squamous metapalsia), 괴사(Necrosis), 섬유화(Fibrosis), 세기관지 상피 탈락(Detachment), 염증세포 침윤(Inflammatory cell infiltration) 등이 관찰되었다. 또한 기관기관지림프절 내 림프구 증식(Lymphoid hyperpalsia)이 관찰되었다.

4) 랫드를 이용한 만성 흡입독성시험

테트라클로로에틸렌을 1년(주5일/56주) 동안 급성 흡입노출시킨 F344 랫의 부검시 간에서 육안적 이상 소견이 관찰되었다. 또한 조직병리학적 검사를 실시한 결과, 신장 세뇨관 상피의 거대핵 소견(Karyomegaly), 간의 선종

(hepatocellular adenoma), 선암종 (hepatocellular adenocarcinoma), 호산성 세포질(Cytoplasmic eosinophilia), 단일세포 괴사(Necrosis, single cell), 간세포 색소침착(Pigmentation), 간세포 공포화 소견(Vacuolation) 등이 관찰되었다.

IV. 고찰

2000년도 이후의 독성시험은 기존의 시험방법을 완전히, 또는 일부 대체해 더 효율적이고 비동물적(Non-animal) 시험을 개발하는 추세이다. 실제로 2007년, 미국의 국립연구위원회(National Research Council)은 “21세기 독성연구”라는 표현을 빌어 비전 및 전략에 대한 보고서를 발표하였다. (National Research Council, 2007) 이후 유럽연합 등에서 2011년에 다수의 연구소 및 공공기관이 참여한 연구사업(SEURAT-1: Safety evaluation ultimately replacing animal testing)을 시작해 동물실험을 완전히 대체하기 위해 프로젝트를 진행했고, 2016년 이 프로젝트의 연장으로 생식독성 및 발달독성 분야의 새로운 프로젝트(ToxRisk)를 추진하고 있다 (EUTOXRISK, 2016). 미국국립보건원에서는 10년 이내 인간의 심장, 간, 신장, 근육, 뇌 등의 조직을 재현한 세포로 동물실험을 대부분 대체해 적은 비용 및 고효율의 안전성시험을 진행할 것으로 예측하고 있다 (Francis Collins, 2016).

국내에서도 3R(Reduction, Refinement, Replacement) 등의 이유로 동물을 이용한(in vivo) 실험보다 시험관적 방법(In vitro, in silico)이 연구되고 있는 추세이지만 화학물질의 독성에 대한 측면에서 아직 요원하다. 2015년 ‘화학물질의 등록 및 평가 등에 관한 법률’ 일명 ‘화평법’이 도입되면서 다수의 화학물질 등록에 필요한 시험 자료의 준비를 위해 많은 동물시험 기관에서 동물 시험이 진행 중이다. 이를 위해 이용될 실험 동물의 수가 정확히 집계되지는 않았지만, 농림축산검역본부의 동물실험 실태 조사에 따르면 2014년 241만, 2015년 250만, 2016년 287만 마리 이상의 실험동물이 국내의 동물실험에 사용된 것으로 집계되고 있다 (농림축산검역본부, 2017). ‘화평법’에 따라 다수의 추가적인 동물 실험을 수행해야 할 필요가 있다고 하지만 이는 세계적 추세에 맞지 않는 상황이다.

또한 4차 산업혁명과 더불어 새로운 조합의 시도들이 계속 진행되고 있다. 컴퓨터, 바이오칩, 인간의 생체조직대체물질 등의 방법으로 기존의 독성 시험을 대체하려는 노력들이 진행되고 있지만 기본적인 데이터의 축적은 아직까지도 동물 실험에서 획득된 자료들을 기반으로 한다. 이에 따라 다양한 생체 지표의 개발은 동물 실험을 대체하거나 실험에 이용되는 동물의 수를 줄이려는 측면에서 환영할 만한 일이다.

생체 지표의 분석에 이용될 수 있는 시료는 매우 다양하다. 대표적으로 혈액, 소변, 뇌척수액, 침, 기관지폐액 등의 액상 시료 (Bock et al., 2010; Morrison et al., 1998; Kropski et al., 2009; Prabhakaran et al., 2003; Maxuitenko et al., 1997)와 조직 생검 등의 고체 시료, 영상 기법 등의 비침습적 방식의 시료로 나눌 수 있는데 이 중 가장 용이하게 사용되는 시료는 혈액이다. 혈액은 혈청(Newman et al., 1993; Ferre et al., 2002; Ding et al., 2001) 또는 혈장(Kropski et al., 2009)을 분리하여 사용하거나 혈액 내 특정 인자(단백질, 효소, DNA 등) 자체를 생체 지표로서 분리해 사용한다. 동물을 이용한 독성시험은 희생을 전제로 하기에 전혈 또는 생체 조직등을 사용할 수 있는데, OECD 가이드라인에 따르면 혈장, 혈청, 소변 또는 기관지폐액 등이 기준으로 제시되고 있다(OECD, 2009).

장기 별 질병에 따른 생체 지표의 개발 연구도 활발히 진행되고 있는데 질환을 특정할 수 있는 생체 지표도 있지만, 여러 생체 지표의 조합을 통해 질환의 경중을 예측하고 예후를 탐색하는 방식도 연구되고 있다. 이중 면역 세포가 분비하는 단백질을 통칭하는 사이토카인은 그 종류에 따라 다른 세포나 스스로에게 영향을 줄 수 있기에 서로 복합적인 작용을 이룬다(Chung, 2001; Luster, 1998; Kelner et al., 1994).

폐의 급성, 만성 손상 및 알러지성 질환에 연관된 생체 지표로서의 사이토카인 및 기타 인자들은 매우 다양한데 이중 IL-1 β (Interleukin-1 beta)는 활성화된 대식구(activated macrophage)에 의해 생산되어 염증성 반응의 중요한 매개체로

작용한다. 또한 세포 활성화, 증식, 분화 및 자가사멸과도 연관되어 있다. IL-10 (Interleukin-10)은 단핵구나 림프구에서 생산되는 사이토카인으로 면역계 조절 및 염증과 관련된 다면적 역할을 수행한다. 염증 관련 사이토카인 (IL-1, IL-6, TNF- α) 등을 억제하거나, IL-4 및 IL-5의 생산을 억제하고, 기관 평활근 세포에서 IL-8, RANTES의 생성을 억제하는 등 혈관의 평활근 증식을 억제한다. 또한 대식구에서 iNOS(inducible nitric oxide synthase) 및 COX-2(inducible cyclooxygenase)의 효소 발현을 억제함으로써 염증에 대한 방어 작용을 수행한다 (Berkman et al., 1995; Niirio et al., 1995). IL-18 (Interleukin-18)은 전-염증 사이토카인(Pro-inflammatory cytokine)으로 NK cell 등의 면역계통에 작용하고 Th1 cell에서 IFN- γ 의 생산을 촉진하는 것으로 알려져 있다(Okamura et al., 1995) 또한 IL-12와 함께 IFN- γ 의 분비를 유도해 Th1 반응을 증진시킨다. 반면 IL-18은 단독적으로 작용 시 Th2 반응을 통해 알러지성 염증을 증가시킨다는 연구 결과도 보고되고 있다(Nakanishi et al., 2001). IL-2 (Interleukin-2)는 T 림프구 및 B 림프구의 증식에 중요한 사이토카인으로 IL-4 분비를 위한 세포의 선택적 분화에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Park et al., 2001). IL-6 (Interleukin-6)는 염증, 감염, 대사 및 재생 과정까지 폭넓게 작용하는 사이토카인이다. 신호 전달 양식에 따라 항염증 작용과 전-염증 작용을 모두 갖고 있는 특수성이 있고 현재 관절염, 염증성 소화계 질환 등에서 치료제로 승인되어 사용되고 있다.

기타 인자로 분석되고 있는 VEGF (Vascular endothelial growth factor)는 혈관 투과성을 증가시켜 혈장 단백질의 유출을 촉진하는 당단백질로, 폐 손상 이후의 회복 과정에서 신생 혈관 생성과 연관된 것으로 알려져 있으며, 혈관 신생과 관련되어 종양의 악성도와 관련된 것으로 알려져 있다 (Dvorak et al., 1992; Medford and Millar, 2006). Von Willebrand factor (vWF)는 지혈과 관련된 당단백질로서 혈관 손상시 혈소판 응집과 혈관 내피 부착에 중요한 역할을 수행한다. 혈관 내피에 손상이 있을 경우 농도가 급격히 증가되는데 급성 폐손상 환자를 통한 연구에서 급격히 농도가 증가된다는 결과 보고가 있다(Rubin et al., 1990).

이번 연구에서 각기 다른 화합물을 이용한 급성, 아급성, 아만성 및 만성 흡입독성 시험을 수행해 혈액에서 사이토카인 생체 지표들을 분석한 결과, 대조군과 투여군간 각 생체 지표의 차이는 관찰되지 않았다. 또한 투여군 별 농도에 따른 차이 및 성별 간 차이도 관찰되지 않았다. Th1 및 Th2 반응과 관련된 사이토카인의 최대 혈중 농도 시기는 자극에 따라 다르지만, 자극 이후 수분 ~ 수십 시간으로 다양하나, 이는 급성 시험의 경우 14일간의 회복기를 거쳐 항상성을 회복한 후 부검을 수행했기 때문으로 여겨진다(Hernandez et al., 2008; McDuffie, 2006). 급성 시험의 조직병리 검사에서 육안적으로 특별한 장기의 이상은 발견되지 않았고, 호흡기의 현미경적 소견도 정상으로 나타났다. 아급성, 아만성 및 만성 시험에서 기존의 수행해왔던 혈액생화학적 수치의 변화는 나타났으나 혈액 시료를 이용한 사이토카인 생체 지표의 변화는 관찰되지 않았다. 특히 아만성 및 만성 시험의 경우 전단계의 농도 결정 실험 결과를 통해 혈액생화학적 수치 및 조직병리검사 상의 분명한 변화가 예상되었고 시험 종료 48 시간 이내 부검 및 혈액 채취를 했으므로 사이토카인의 변화가 관찰될 것으로 예상했으나 측정 표준용액의 최저치에 달하는 저농도에서 검출된 관계로 군별 유의성은 관찰할 수 없었다. 또한 VEGF의 경우 랫드의 심근염 모델을 이용한 시험에서 혈청 VEGF의 농도는 6시간부터 증가해 최대 농도 도달 시간은 24시간으로 나타났으며 시험 종료 14일 이후에도 증가상태인 연구결과가 있어 (Yin et al., 2000) 염증성 병변이 예상되는 시험에서 증가될 것으로 추정했으나 역시 표준용액의 최저 수준의 저농도가 검출되었다.

본 연구에서 소량의 혈액 중의 생체 지표 검출을 위한 방법으로 Luminex사의 Multiplex 검증 기법을 이용하였으나, 일반적으로 사이토카인의 검출에 이용되는 ELISA와는 다르게 기법에 사용되는 물질의 종류에 따라 민감도의 차이가 있고, 특히 사이토카인은 샘플링, 저장 및 해동 온도의 영향을 다소 받으며 연구에 사용된 혈청이 혈장보다 환경 변화에 민감하기 때문인 것으로 여겨진다. (Dupont NC; Parkitny et al., 2013).

V. 결론

생체지표(biomarker)는 자극에 대한 생체의 변화를 탐지해 낼 수 있는 일종의 정보로 화학 물질에 대한 체내 대사 산물로 대표될 수 있다. 독성 시험에서 주로 사용되고 있는 생체지표들은 한정적이고 장기적 자극에 의한 손상을 탐지하는 지표가 대부분이다. 이에 독성 시험에서 흡입 독성연구센터에서 수행 중인 동물을 이용해 흡입독성시험의 결과의 조기 탐색과 신뢰성을 향상시킬 수 있는 유용한 생체 지표를 실험적으로 탐색했다.

생체 지표의 특성 및 용도에 따른 분류와 산업보건 측면에서의 생체지표의 기존 활용 범위를 조사 연구 및 일반적인 독성시험에서 활용되고 있는 생체 지표를 문헌 조사한 결과 흡입독성연구센터에서 수행하는 동물시험에서 분석하고 있는 생체 지표와 대부분 일치하였다. 2,6-디-삼차-부틸-파라-크레졸, 노말 프로필 알콜, 폴리헥사메틸렌구아니딘 염산염, 테트라클로로에틸렌을 이용해 랫드에서 흡입독성 시험을 수행해 혈액 및 장기 시료를 분석한 결과 호흡기의 염증과 관련 있는 것으로 알려진 단백질 지표인 vWF, IL-1 β , IL-10, IL-18, IL-2, IL-6, VEGF의 농도는 시험물질에 의한 변화를 나타내지 않았다. 그러나 동일한 실험에서 기존에 수행해 왔던 혈액 생화학 검사를 통한 혈액 내 지표와 현미경 검경을 통한 장기의 형태학적 변화가 관찰되었다. 결론적으로, 소량의 시료를 이용하기 위해 실시한 Multiflex(Luminex)기법은 검출 농도의 한계로 저농도에서 분석의 신뢰도가 떨어지는 것으로 생각되며, 특정 장기의 정확한 생체 지표 분석을 위해서 장기 조직을 이용하거나 유전체 연구를 통한 분석이 민감성과 효율적 측면에서 유용할 것으로 생각된다.

참고문헌

- 1) 고용노동부. 산업안전보건법 시행규칙. 2017. Available from <http://www.law.go.kr/lsInfoP.do?lsiSeq=122531#0000>
- 2) 농림축산검역본부. 동물실험윤리위원회 운영실적 및 실험동물 사용실태. 2017. Available from <http://www.animal.go.kr/aec/main/main.jsp>
- 3) 산업안전보건연구원. 근로자건강진단 실무지침 제1권 특수건강진단. 2015. Available from : <https://oshri.kosha.or.kr/bridge?menuId=2890>
- 4) 임춘화, 생체 지표 시장동향 및 전망, 산업융합과 신성장동력. 2013;(34):2
- 5) Abramson MJ, Perret JL, Dharmage SC, et al. Distinguishing adult-onset asthma from COPD: a review and a new approach. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis 2014;9:945-962
- 6) Allakhverdi Z, Comeau MR, Jessup HK, et al. Thymic stromal lymphopoietin is released by human epithelial cells in response to microbes, trauma, or inflammation and potently activates mast cells. J Exp Med 2007;204:253-258
- 7) Amacher DE, Schomaker SJ, Burkhardt JE. The relationship among microsomal enzyme induction, liver weight and histological change in beagle dog toxicology studies. Food Chem Toxicol 2001;39(8):817-825
- 8) Amacher DE. Serum transaminase elevations as indicators of hepatic injury following the administration of drugs. Regul Toxicol Pharmacol 1998;27(2):119-130
- 9) Amir-Aslani A and Mangematin V. The future of drug discovery and development : shifting emphasis towards personalized medicine, Technological forecasting and social change, Technol Forecast Soc Change 2010;77(2):203-217
- 10) Andrew DP, Chang MS, McNinch J, et al. STCP-1 (MDC) CC chemokine

acts specifically on chronically activated Th2 lymphocytes and is produced by monocytes on stimulation with Th2 cytokines IL-4 and IL-13. *J Immunol* 1998;161(9):5027-5038

- 11) Barczyk A, Pierzchała W, Kon OM, et al. Cytokine production by bronchoalveolar lavage T lymphocytes in chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:1484-1492
- 12) Barnes PJ. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest* 2008;118(11):3546-3556
- 13) Barnett N and Ware LB. Biomarkers in acute lung injury-marking forward progress. *Crit Care Clin* 2011;27(3):661-683
- 14) Berdanier CD. Mitochondria in health and disease. Boca Raton FL: CRC Press. 2005
- 15) Berkman N, John M, Roesems G, et al. Inhibition of macrophage inflammatory protein-1 alpha expression by IL-10. Differential sensitivities in human blood monocytes and alveolar macrophages. *J Immunol* 1995;155:4412-4418
- 16) Bochner BS and Busse WW. Allergy and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:953-959
- 17) Bock MD, Seny D, Meuwis MA, et al. Challenges for Biomarker Discovery in Body Fluids Using SELDI-TOF-MS, *J Biomed Biotechnol* 2010;2010:906082
- 18) Boone L Meyer D, Cusick P, et al. Selection and interpretation of clinical pathology indicators of hepatic injury in preclinical studies. *Vet Clin Pathol* 2005;34(3):182-188
- 19) Boxall C, Holgate ST, Davies DE. The contribution of transforming growth factor- β and epidermal growth factor signalling to airway

- remodelling in chronic asthma. *Eur Respir J* 2006;27:208-229
- 20) Brewster CEP, Howarth PH, Djukanovic R, et al. Myofibroblasts and subepithelial fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990;3:507-511
- 21) Calfee CS, Eisner MD, Parsons PE, et al. Soluble intercellular adhesion molecule-1 and clinical outcomes in patients with acute lung injury. *Intensive Care Med* 2009;35(2):248-257
- 22) Celli BR, Locantore N, Yates JT, et al. Inflammatory biomarkers improve clinical prediction of mortality in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;185:1065-1072
- 23) Chroneos ZC, Sever-Chroneos Z, Shepherd VL. Pulmonary surfactant: an immunological perspective. *Cell Physiol Biochem* 2010;25(1):13-26
- 24) Chung KF. Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2001;18:Suppl.34,50s-59s
- 25) Clayton TA, Lindon JC, Everett JR, et al., An hypothesis for a mechanism underlying hepatotoxin-induced hypercreatinuria. *Arch Toxicol* 2003;77(4):208-17
- 26) Cohen MJ, Brohi K, Calfee CS, et al. Early release of high mobility group box nuclear protein 1 after severe trauma in humans: role of injury severity and tissue hypoperfusion. *Crit Care* 2009;13(6):R174
- 27) de Haas M, Kerst JM, van der Schoot CE, et al. Granulocyte colony-stimulating factor administration to healthy volunteers: analysis of the immediate activating effects on circulating neutrophils. *Blood* 1994;84:3885-3894
- 28) Deckers J, Branco Madeira F, Hammad H. Innate immune cells in asthma. *Trends Immunol* 2013;34:540-547
- 29) Dentener MA, Vreugdenhil AC, Hoet PH, et al. Production of the

- acute-phase protein lipopolysaccharide-binding protein by respiratory type II epithelial cells: implications for local defense to bacterial endotoxins. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;23(2):146-153
- 30) Devarajan P. Emerging urinary biomarkers in the diagnosis of acute kidney injury. *Expert Opin Med Diagn* 2008;2(4):387-398
 - 31) Dinarello CA. Interleukin-18 and the pathogenesis of inflammatory diseases. *Semin Nephrol* 2007;27:98-114
 - 32) Ding H, Chen Y, Feng X, et al., Correlation between liver fibrosis stage and serum liver fibrosis markers in patients with chronic hepatitis B. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2001;9(2):78-80
 - 33) Dote TK, Kono K, Usuda H, et al. Acute renal damage dose response in rats to intravenous infusion of sodium fluoride. *Fluoride Quarterly report* 2000;33:210-217
 - 34) Dragon S, Rahman MS, Yang J, et al. IL-17 enhances IL-1 β -mediated CXCL-8 release from human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;292:L1023-L1029
 - 35) Druilhe A, Letuve S, Pretolani M. Glucocorticoid-induced apoptosis in human eosinophils: mechanisms of action. *Apoptosis* 2003;8:481-495.
 - 36) Dupont NC, Wang K, Wadhwa PD, et al. Validation and comparison of luminex multiplex cytokine analysis kits with ELISA: determinations of a panel of nine cytokines in clinical sample culture supernatants. *J Reprod Immunol* 2005;66(2):175-191
 - 37) Dvorak HF, Nagy JA, Berse B, et al. Vascular permeability factor, fibrin and the pathogenesis of tumor stroma formation. *Ann N Y Acad Sci* 1992;667:110-111
 - 38) Eti S, Cheng CY, Marshall A, et al. Urinary clusterin in chronic nephrotoxicity in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1993;202(4):487-490

- 39) EUTOXRISK. 2016. Available from: <http://www.eu-toxrisk.eu/>
- 40) Evans GO. Animal Clinical Chemistry, 2nd ed. New York: CRC Press: 2009. p.37-57
- 41) Evans GO. Further observations on plasam γ glutamyltransferase activity after oral administration of α naphylisothiocyanate. Human Toxicology 1986;(5)120-121
- 42) Feltis BN, Wignarajah D, Zheng L, et al. Increased vascular endothelial growth factor and receptors: relationship to angiogenesis in asthma. Am J Respir Crit Care Med 2006;173:1201-1207
- 43) Ferre N, Camps J, Prats E, et al. Serum paraoxonase activity: a new additional test for the improved evaluation of chronic liver damage. Clin Chem 2002;48(2):261-268
- 44) Fiedler U and Augustin HG. Angiopoietins: a link between angiogenesis and inflammation. Trends Immunol 2006;27(12):552-558
- 45) Fort MM, Cheung J, Yen D, et al. IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. Immunity 2001;15:985-995
- 46) Franchini M and Lippi G. Von Willebrand factor and thrombosis. Ann Hematol 2006;85(7):415-423
- 47) Francis Collins. FY2017 National Institutes of Health Budget Request 2016. Available from: <https://www.appropriations.senate.gov/hearings/hearing-on-fy2017-national-institutes-of-health-budget-request>
- 48) Fremont RD, Koyama T, Calfee CS, et al. Acute lung injury in patients with traumatic injuries: utility of a panel of biomarkers for diagnosis and pathogenesis. J Trauma 2010;68(5):1121-1127
- 49) Gajewska BU, Wiley RE, Jordana M. GM-CSF and dendritic cells in allergic airway inflammation: basic mechanisms and prospects for therapeutic intervention. Curr Drug Targets Inflamm Allergy 2003;2:279-292

-
- 50) Glatz JF and van der Vusse GJ. Cellular fatty acid-binding proteins: their function and physiological significance. *Prog Lipid Res* 1996;35(3):243-282
 - 51) Han WK, Bailly V, Abichandani R, et al. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int.* 2002;62(1):237-244
 - 52) Hardisty JF and Brix AE. Comparative hepatic toxicity: prechronic/chronic liver toxicity in rodents. *Toxicol Pathol* 2005;33(1):35-40
 - 53) Hawrylowicz C.M. Regulatory T cells and IL-10 in allergic inflammation. *J Exp Med* 2005;202:1459-1463
 - 54) Hernandez Cruz A, Garcia-Jimenez S, Zucatelli Mendonca R, et al. Pro- and anti-inflammatory cytokines release in mice injected with *Crotalus durissus terrificus* venom. *Mediators Inflamm* 2008;2008:874962
 - 55) Hirst SJ, Barnes PJ, Twort CH. Quantifying proliferation of cultured human and rabbit airway smooth muscle cells in response to serum and platelet-derived growth factor. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992;7:574-581
 - 56) Hurst JR, Vestbo J, Anzueto A, et al. Susceptibility to exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2010;363:1128-1138
 - 57) Insight Pharma Report. Disease-related biomarker (2007) and Molecular diagnostics (2009). Available from <http://www.insightpharmareports.com/>
 - 58) Kaptoge S, Di Angelantonio E, Lowe G, et al. C-reactive protein concentration and risk of coronary heart disease, stroke, and mortality: an individual participant meta-analysis. *Lancet* 2010;375:132-140
 - 59) Katayama M, Ishizaka A, Sakamoto M, et al. Laminin gamma2 fragments are increased in the circulation of patients with early phase acute lung injury. *Intensive Care Med* 2010;36(3):479-486
 - 60) Kelner GS, Kennedy J, Bacon KB, et al. Lymphotoxin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* 1994;266:1395-1399

- 61) Khair OA, Devalia JL, Abdelaziz MM, et al. Effect of Haemophilus influenzae endotoxin on the synthesis of IL-6, IL-8, TNF- α and expression of ICAM-1 in cultured human bronchial epithelial cells. Eur Respir J 1994;7:2109-2116
- 62) Khwaja A, Carver JE, Linch DC. Interactions of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF), granulocyte CSF, and tumor necrosis factor α in the priming of the neutrophil respiratory burst. Blood 1992; 79:745-753.
- 63) Kips JC, Tavernier JH, Joos GF, et al. The potential role of tumor necrosis factor α in asthma. Clin Exp Allergy 1993;23:247-250
- 64) Kips JC, Fahy JV, Hargreave FE, et al. Methods for sputum induction and analysis of induced sputum: a method for assessing airway inflammation in asthma. Eur Respir J Suppl 1998;26:9S-12S
- 65) Konradsen JR, James A, Nordlund B, et al. The chitinase-like protein YKL-40: a possible biomarker of inflammation and airway remodeling in severe pediatric asthma. J Allergy Clin Immunol 2013;132:328-335
- 66) Kropski JA, Fremont RD, Calfee CS, et al. Clara cell protein (CC16), a marker of lung epithelial injury, is decreased in plasma and pulmonary edema fluid from patients with acute lung injury. Chest 2009; 135(6):1440-1447
- 67) Kumar RK, Webb DC, Herbert C, et al., Interferon-gamma as a possible target in chronic asthma. Inflamm Allergy Drug Targets 2006;5(4):253-256.
- 68) Langer HF, Chavakis T. Leukocyte-endothelial interactions in inflammation. J Cell Mol Med 2009;13(7):1211-1220
- 69) Laun RA, Rapsch B, Abel W, et al. The determination of ketone bodies: preanalytical, analytical and physiological considerations. Clin Exp Med

2001;1(4):201-209

- 70) Lee WM. Drug-induced hepatotoxicity. *N Engl J Med* 2003;249(5):474-485
- 71) Lock-Johansson S, Vestbo J, Sorensen GL. Surfactant protein D, Club cell protein 16, Pulmonary and activation-regulated chemokine, C-reactive protein, and Fibrinogen biomarker variation in chronic obstructive lung disease. *Respir Res* 2014;25;15:147
- 72) Lomas DA, Silverman EK, Edwards LD, et al. Evaluation of COPD Longitudinally to Identify Predictive Surrogate Endpoints (ECLIPSE) investigators. Evaluation of serum CC-16 as a biomarker for COPD in the ECLIPSE cohort. *Thorax* 2008;63:1058-1063
- 73) Lord BI, Bronchud MH, Owens S, et al. The kinetics of human granulopoiesis following treatment with granulocyte colony-stimulating factor in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:9499-9503
- 74) Luster AD. Chemokines: chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998;338:436-445
- 75) Mardini H and Record C. Detection assessment and monitoring of hepatic fibrosis: biochemistry or biopsy? *Ann Clin Biochem.* 2005;42:441-447
- 76) Masubuchi T, Koyama S, Sato E, et al. Smoke extract stimulates lung epithelial cells to release neutrophil and monocyte chemotactic activity. *Am J Pathol* 1998;153:1903-1912
- 77) Matsumoto K, Takuwa A, Terashi A. Correlation between ketone body level in selenium-deficient rats and oxidative damages. *Biol Pharm Bull* 2005;28(7):1142-1147
- 78) Maxuitenko YY, North WG, Roebuck BD. Urinary taurine as a non-invasive marker of aflatoxin B1-induced hepatotoxicity: success and failure. *Toxicology* 1997;28;118:159-169

- 79) McDuffie E, Obert L, Chupka J et al. Detection of cytokine protein expression in mouse lung homogenates using suspension bead array. *J Inflamm* 2006;3:15
- 80) Medford AR, Millar AB. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in acute lung injury (ALI) and acute respiratory distress syndrome (ARDS): paradox or paradigm? *Thorax* 2006; 61(7):621-626.
- 81) Minshall EM, Leung DY, Martin RJ, et al. Eosinophil-associated TGF-beta1 mRNA expression and airways fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997;17:326-333
- 82) Moro K, Yamada T, Tanabe M, et al. Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+) Sca-1(+) lymphoid cells. *Nature* 2010;463:540-544
- 83) Morrison D, Strieter RM, Donnelly SC, et al. Neutrophil chemokines in bronchoalveolar lavage fluid and leukocyteconditioned medium from nonsmokers and smokers. *Eur Respir J* 1998;12:1067-1072
- 84) Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, et al. Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001;12(1):53-72
- 85) Nassenstein C, Kutschker J, Tumes D, et al. Neuro-immune interaction in allergic asthma: role of neurotrophins. *Biochem Soc Trans* 2006;34:591-593
- 86) National Research Council. Toxicity Testing in the 21st Century: A vision and a Strategy 2007. Washington DC, The National Academies Press;2007
- 87) Newman W, Beall LD, Carson CW, et al. Soluble E-selectin is found in supernatants of activated endothelial cells and is elevated in the serum of patients with septic shock. *J Immunol.* 1993;150(2):644-654
- 88) Niiro H, Otsuka T, Tanabe T, et al. Inhibition by interleukin-10 of

- inducible cyclooxygenase expression in lipopolysaccharide stimulated monocytes : its underlying mechanism in comparison with interleukin-4. *Blood* 1995;85:3736-45.
- 89) OECD. OECD Guidelines for the testing of chemicals. Test No. 412: Subacute Inhalation Toxicity: 28-Day Study. 2009. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development. Available from: <http://www.oecd.org/env/>
 - 90) OECD. OECD Guidelines for the testing of chemicals. Test No. 413: Subchronic Inhalation Toxicity: 90-Day Study. 2009. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development. Available from: <http://www.oecd.org/env/>
 - 91) OECD. OECD Guidelines for the testing of chemicals. Test No. 452: Chronic Toxicity Studies. 2009. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development.
 - 92) Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, et al. Cloning of a new cytokine that induces INF-gamma production by T cells. *Nature* 1995;378(6552):88-91
 - 93) Otsyula M, King MS, Ketcham TG, et al., Oxidative stress in rats after 60 days of hypergalactosemia or hyperglycemia. *Int J Toxicol* 2003 ;22(6):423-427.
 - 94) Park WY, Goodman RB, Steinberg KP, et al. Cytokine balance in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164:1896-1903
 - 95) Parkitny L, McAuley JH, Kelly PJ, et al. Multiplex cytokine concentration measurement: how much do the medium and handling matter? *Mediators Inflamm* 2013;2013:890706
 - 96) Prabhakaran P, Ware LB, White KE, et al. Elevated levels of plasminogen activator inhibitor-1 in pulmonary edema fluid are associated with mortality in acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;285(1):L20-L28.

- 97) Rabb H. Evaluation of urinary markers in acute renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1998;7(6):681-685.
- 98) Ravensberg AJ, Ricciardolo FL, van Schadewijk A, et al. Eotaxin-2 and eotaxin-3 expression is associated with persistent eosinophilic bronchial inflammation in patients with asthma after allergen challenge. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:779-785.
- 99) Reber L, Da Silva CA, Frossard N. Stem cell factor and its receptor c-Kit as targets for inflammatory diseases. *Eur J Pharmacol* 2006;533:327-340
- 100) Robinson DS, Hamid Q, Ying S, et al. Predominant Th2-type bronchoalveolar lavage T-lymphocyte population in atopic asthma. *New Engl J Med* 1992;326:298-304.
- 101) Rosenwasser LJ, Biologic activities of IL-1 and its role in human disease. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102:344-350
- 102) Rubin DB, Wiener-Kronish JP, Murray JF, et al. Elevated von Willebrand factor antigen is an early plasma predictor of acute lung injury in nonpulmonary sepsis syndrome. *J Clin Invest.* 1990; 86(2):474-480
- 103) Rutgers HC, Batt RM, Vaillant C, et al. Subcellular pathologic features of glucocorticoid-induced hepatopathy in dogs. *Am J Vet Res* 1995;56(7):898-907
- 104) Shu KH, Wang CH, Wu CH et al. Urinary π -glutathione S-transferase Predicts Advanced Acute Kidney Injury Following Cardiovascular Surgery. *Sci Rep* 2016;6:26335
- 105) Sim DW and Lee JH. Biomarkers of adult asthma and personalized medicine *Allergy Asthma Respir Dis* 2016;4(1):4-13
- 106) Simpson A, Soderstrom L, Ahlstedt S, et al. IgE antibody quantification and the probability of wheeze in preschool children. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:744-749

-
- 107) Stirling RG, van Rensen EL, Barnes PJ, et al. Interleukin-5 induces CD34(+) eosinophil progenitor mobilization and eosinophil CCR3 expression in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1403-1409
 - 108) Stonard MD, Gore CW, Oliver GJ, et al. Urinary enzymes and protein patterns as indicators of injury to different regions of the kidney. *Fundam Appl Toxicol* 1987;9(2):339-351
 - 109) Takala A, Jousela I, Takkunen O, et al. A prospective study of inflammation markers in patients at risk of indirect acute lung injury. *Shock* 2002;17(4):252-257
 - 110) Takeyama K, Dabbagh K, Lee HM, et al. Epidermal growth factor system regulates mucin production in airways. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96: 3081-3086
 - 111) Takeyama K, Fahy JV, Nadel JA. Relationship of epidermal growth factor receptors to goblet cell production in human bronchi. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:511-516
 - 112) Taracha E, Habrat B, Lehner M, et al. Alanine aminopeptidase activity in urine: a new marker of chronic alcohol abuse? *Alcohol Clin Exp Res* 2004;28(5):729-735
 - 113) Tarloff JB and Lash LH. Toxicology of the kidney: Target organ toxicology series, 3rd ed. Boca Raton, FL: CRC Press. 2004
 - 114) Trinchieri G, Pflanz S, Kastelein RA. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity* 2003;19:641-644
 - 115) Usuda K, Kono K, Dote T, et al. Usefulness of the assessment of urinary enzyme leakage in monitoring acute fluoride nephrotoxicity. *Arch Toxicol* 1999;73(6):346-351
 - 116) van Meurs M, Mumpers P, Lintenberg JJ, et al. Bench-to-bedside review:

- Angiotensin signalling in critical illness - a future target? *Crit Care* 2009;13(2):207
- 117) Vestbo J, Edwards LD, Scanlon PD, et al. Changes in forced expiratory volume in 1 second over time in COPD. *N Engl J Med* 2011;365:1184-1192.
 - 118) Vignola AM, Chanez P, Chiappara G, et al. Transforming growth factor- β expression in mucosal biopsies in asthma and chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:591-599
 - 119) Walshe CM, Odejayi F, Ng S, et al. Urinary glutathione S-transferase as an early marker for renal dysfunction in patients admitted to intensive care with sepsis. *Crit Care Resusc* 2009;11(3):204-209
 - 120) Walz A, Peveri P, Aschauer H, et al. Purification and amino acid sequencing of NAF, a novel neutrophil-activating factor produced by monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1987;149:755-761
 - 121) Ware LB, Koyama T, Zhao Z et al. Biomarkers of lung epithelial injury and inflammation distinguish severe sepsis patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care* 2013;17(5):R253
 - 122) Wills-Karp M. Interleukin-13 in asthma pathogenesis. *Immunol Rev* 2004;202:175-90
 - 123) Woodruff PG, Boushey HA, Dolganov GM, et al. Genome-wide profiling identifies epithelial cell genes associated with asthma and with treatment response to corticosteroids. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:15858-15863
 - 124) Yin R, Feng J, Yao Z. Dynamic changes of serum vascular endothelial growth factor levels in a rat myocardial infarction model. *Chin Med Sci J* 2000;15(3):154-156
 - 125) Zimmerman H. Chemical injury and its detection. In: Plaa GL and Hewitt WR, editors. *Toxicology of the liver*. New York: Raven Press; 1982

Abstract

Study on the Biomarkers of Inhalation toxicity Using Laboratory Animals

Eun-Sang Cho, Yong-Hyun Chung, Hye-Youn Choi

*Occupational Safety Research Department,
Occupational Safety and Health Research Institute, KOSHA*

Objective : The biomarker is a 'characteristic' which found in blood, other body fluids, or tissues and can be a sign of a normal or abnormal process, or of a condition or disease and the body responds to a treatment. Various biological indicators are exist and currently being developed, but the main biomarkers commonly used in toxicity studies are limited to long term stimuli or chronic organ toxicities. Therefore, we are looking for the biomarkers that can improve the initial response to toxicity by inhalation toxicity and reliability of the results by using laboratory animals that are undergoing toxicity studies in the Inhalation Toxicity Research Center.

Method : we investigated the property, classification and the uses of occupational health of biomarkers by literature survey. Also we performed the acute, subacute, subchronic and chronic inhalation toxicity studies using 2,6-di-tert-butyl- ρ cresol, n-propanol, Polyhexamethylene guanidine hydrochloride and tetrachloroethylene in rats. The blood biochemistry, histopathological

investigations and serum biomarkers associated with the inflammation of the respiratory tract were investigated.

Result : According to a literature survey, the indicators analyzed in toxicity studies of Inhalation Toxicity Research Center were mainly consistent with the biomarkers used in general toxicity studies. The serum biomarkers including Von Willebrand factor, Interleukin-1 β , 2, 6, 10, 18 and vascular endothelial growth factor were not altered by the inhalation of test substance. However, the physiological changes through biomarkers from blood biochemistry test and the morphological changes of the organs through microscopic examination were noted in the same studies.

Conclusion : The protein analysis or genomics studies are recommended for sensitivity and efficiency of accurate biomarker analysis to determine the organ damage by the toxicity of chemicals.

Keywords : biomarker, inhalation toxicity, blood, serum

〈〈연 구 진〉〉

연 구 기 관 : 안전보건공단 산업안전보건연구원

연구책임자 : 조 은 상 (연구위원, 산업화학연구실)

연 구 원 : 정 용 현 (연구위원, 산업화학연구실)

최 혜 연 (연 구 원, 산업화학연구실)

〈〈연 구 기 간〉〉

2017. 1. 1 ~ 2017. 11. 30

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

산업안전보건연구원장

흡입노출 실험동물을 이용한 생체영향 지표 연구
-호흡기계를 중심으로-

2017-연구원-973

발 행 일 : 2017년 11월 30일
발 행 인 : 산업안전보건연구원장
연구책임자 : 산업화학연구실 조 은 상
발 행 처 : 안전보건공단 산업안전보건연구원
주 소 : (34122) 대전광역시 유성구 엑스포로 339번길 30
전 화 : (042) 869-8534
F A X : (042) 869-8694
Homepage : <http://oshri.kosha.or.kr>
