



사업장 내 화학물질에 의한 알러지성 호흡기질환의 AOP 연계 연구

OSHRI

산업재해예방

안전보건공단

산업안전보건연구원



연구보고서

사업장 내 화학물질에 의한 알러지성 호흡기질환의 AOP 연계 연구

조은상·차효근

산업재해예방

안전보건공단

산업안전보건연구원



요약문

- 연구기간 2021년 01월 ~ 2021년 11월
- 핵심단어 독성발현경로, 직업성 천식, 화학물질, 호흡기질환, 활성산소
- 연구과제명 사업장 내 화학물질에 의한 알러지성 호흡기질환의 AOP 연계 연구

1. 연구배경

- 직업성 알러지성 호흡기질환(천식 등)은 화학물질, 곡물 분진 등 작업장 내 다양한 물질에 노출되어 항원에 의한 알레르기 반응을 일으키는 면역성 질환의 일종으로, 유병 근로자를 확인하기 위한 현재의 임상 기준 검사들은 비용 및 검사기간 등의 이유로 진단 및 직업성 여부를 확인하기 어려움이 있다.
- 사업장 내 화학물질의 노출에 의한 직업성 알러지성 호흡기질환(천식 등)의 초기 탐색을 위한 질병 관련 마커의 발굴을 위한 추가 연구로서, 다량 화학물질의 규제·관리를 위해 기존의 동물 실험을 대체하기 위해 개발된 기법 중 컴퓨터 분석(*In silico*) 및 시험관내 실험(*In vitro*) 위주의 개발이 필요하다.
- 독성발현경로(AOP)는 분자 수준, 세포, 조직 반응 및 현상적으로 관찰할 수 있는 최종 단계의 악영향까지 모든 기전을 표현한 일종의 생물학적 지도로, 2020년 수행한 “화학물질에 의한 면역성 질환의 AOP 적용 연구”를 통해 직업성 알러지성 호흡기질환에 적용할 수 있는 AOP 지도 경로 및 초기 진단을 위한 유용한 마커를 탐색하였다. 그러나 제안된 AOP 및 마커를 질환에 적용하기 위해서 실질적인 실험 검증 연구가 필요하다.

- 따라서 AOP를 이용하여 직업성 알러지성 호흡기질환에 관련된 독성 메커니즘 및 유용한 마커 등을 실험적 연구를 통해 검증하여, 질환 관련 지표를 실험적 탐색 및 제시하고자 하였다.

2. 주요 연구내용

○ 직업성 천식 질환 관련 AOP의 최신 연구 동향 확인

기존 직업성 알러지성 호흡기질환과 관련되어 조사하였던 AOP의 일부 내용을 최신화 하였다. 해당 AOP에서는 업데이트를 통해 AO를 유발하는 첫 단계인 MIE를 변경함으로써 기존의 lysine residue로 한정되었던 공유결합의 범위를 제한하지 않고 확대하여 추가적인 화학물질에 의한 AO의 시작 가능성을 제시하였다.

○ 실험적 증빙을 통한 지난 연구과제 제안 AOP 및 관련 KE의 확인

in vitro 실험을 통해 제안된 직업성 알러지성 호흡기 질환 AOP 내용의 실험적 확인을 위해 저분자화합물 위주의 시험 물질을 선정 후 사람 호흡기 세포의 3D-cell model을 이용하여 세포 독성, 산화적 손상 관련 지표 및 염증 관련 cytokine/chemokines을 탐색하고, 구성 조직의 형태적 변화를 확인하였다.

- 실험을 위하여 3차원 배양을 통해 상부 및 하부 호흡기 상피의 직접적인 형태 및 기능적 특성을 재현할 수 있도록 제작된 Mucilair™ 및 Smallair™ 세포 모델을 선택하여 이용하였으며, 천식 환자의 세포로 구성된 Smallair™-asthma 모델을 함께 실험하여 동일 화학물질에 대한 정상인과 천식환자의 생체 내 변화를 탐색하였다.
- 저분자량 직업성 천식 유발물질 중 노출 보고가 많은 디이소시아네이트(Diisocyanates) 및 무수물(anhydride)을 선택하여 30~300 uM의 메

틸렌 다이페닐 다이아이소시아네이트(Methylene Diphenyl diisocyanate, MDI), 0.2~5 mM 톨루엔 다이소시아네이트(Toluene diisocyanate, TDI) 및 5~500 μ M 트리멜리트산무수물(Trimellitic anhydride, TMA)을 시험 물질로 사용하였다.

- 시험 물질에 의한 3D-cell model의 손상을 확인하기 위해 시험물질 투여 24 또는 48시간 후 채취된 세포배양 상층액을 이용한 LDH (lactate dehydrogenase) 활성 분석을 통해 세포 누출 손상 결과를 확인하였으며, 세포 손상이 심한 48시간의 결과를 제외하고 각 호흡기계 모델에서 시험물질에 의한 농도별 세포 손상을 확인할 수 있었다.
- 또한 산화적 손상 관련 변화를 알아보기 위하여 시험물질 투여 24 또는 48시간 후 채취된 세포배양 상층액에서 존재하는 ROS/RNS 정도를 측정하였으며, 천식 환자 하부 호흡기계 모델의 경우 시험물질 투여에 의한 ROS/RNS양의 뚜렷한 증가를 확인할 수 있었고, 정상인 상부호흡기계 모델에서는 24시간 및 48시간에서 TDI 농도 별 증가가 확인되었고, MDI 및 TMA는 대조군에 비해 증가하였으며, 정상인의 하부호흡기계 모델에서 48시간에서 모든 시험 물질에 의한 증가가 확인되었다.
- 시험물질의 농도 및 시간별 노출에 따른 변화를 확인하기 위해 세포배양 상층액을 이용하여 기도 내 재구성과 염증 관련 지표를 알아보기 위해 다양한 종류의 cytokine 및 chemokine 정도를 측정하였다. 정상인의 각 호흡기계 모델에서 시험물질 노출에 의해 cytokine 및 chemokine의 특정할 만한 변화는 보이지 않았으나, 천식 환자 하부 호흡기계 모델의 경우 정상인에 비해 몇몇 cytokine 및 chemokine의 변화가 확인되었으며, 농도별 TDI 투여에 의한 변화도 확인되었다.
- 조직병리학적 검사를 통해 시험물질의 농도 및 시간별 노출에 의한 각 3D-cell model의 형태학적 변화를 확인하였다. 상부호흡기계 모델의 경우 각 단면은 세포 손상 정도에 따라 상피 세포의 높이 변화, 상피 탈락,

비정형 변성 등의 변화를 보였고, 하부호흡기계 모델에서는 상피세포의 hyperplasia 및 cyst 형성이 관찰되었으며, 심한 경우 배양판에서 탈락하였고, 천식 환자 하부호흡기계 모델은 대조군에서 호흡기계 상피의 변성을 확인할 수 있었으며, 시험 물질의 투여에 의해 변성의 정도가 증가하고 손상으로 인한 상피 탈락 구간이 확인되었다.

- 호흡기계 모델의 점액분비 세포에서 각 시험물질 투여 후 점액 분비가 증가하였으나 48시간 투여군 중 손상이 심해 탈락된 부분에서는 분비가 상대적으로 적어 보였으며, 천식 환자 하부호흡기계 모델에서는 대조군에서 다량의 점액 분비가 확인되었으나, MDI를 제외한 나머지 물질에서 시험 물질의 투여에 의한 점액 분비가 대조군과 큰 차이를 보이지 않았다.

○ AOP의 적용과 시사점

인체 호흡기계 세포로 구성된 3D-cell model을 통해 직업성 천식 관련 제안된 AOP 및 KE를 실험적으로 확인하였다. *In vitro* 실험을 통해 MDI, TDI 및 TMA에 의한 호흡기계 세포 자극 및 손상이 확인되었고, 이와 관련되어 산화적 손상의 지표인 ROS/RNS의 변동을 확인할 수 있었다. 그러나 다음 단계로 제안된 생체 내 cytokine 및 chemokine의 경우 천식환자의 3D-cell model에서 변화가 확인되었고 TDI의 경우 농도에 의한 변화가 보였으나, 각 요인 별 구성 세포 내 유전체 분석이나 면역관련 세포의 co-culture를 통한 호흡기계 모델을 이용한 추가적 실험적 증빙이 필요할 것으로 여겨진다.

3. 연구 활용방안

- 특정 화학물질 노출에 의한 직업성 알러지성 호흡기질환의 메카니즘 연구를 위한 실험적 데이터 생산으로 해당 질환의 AOP 작성에 대한 연구적 성과 자료 추가
- 직업성 알러지성 호흡기 질환의 초기진단을 위하여 산화적 스트레스 관련 사항 제안을 통해 직업성 호흡기 질환에 의한 근로자의 건강장해 예방 가능성
- 대체시험 관련 연구전문 사업 또는 급성흡입독성시험의 시스템적 보완을 위한 자료로 활용 가능
- 논문, 보고서 작성 배포를 통한 화학물질 또는 구조적 유사 물질 등의 시험 관련 정보 제공

4. 연락처

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

목 차

I. 서 론	1
1. 화학물질 등의 독성시험 방향 전환	3
1) 대체 시험법의 개발	3
2) 대체 시험법에서 주목받는 새로운 개념 : AOP	4
2. 화학물질과 직업성 천식	7
1) 직업성 천식의 종류 및 고려 사항	7
2) 직업성 천식의 주요 유발 물질	8
3. AOP를 통해 분석된 직업성 알러지성 호흡기 질환	8
1) 직업성 천식 유발 화학물질과 AOP 연동 조사	8
2) 천식 관련 AOP 조사	8
3) 추가 AOP 제안	10
4. 연구 목적	10
1) AOP 관련 후속 연구 진행	10
2) 실험적 탐색을 통한 AOP 관련 지표 제시	10

목 차

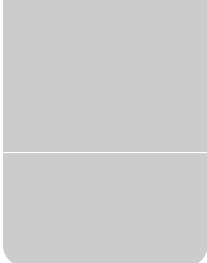
II. 연구방법	11
1. 연구 범위	13
1) AOP 관련 분자적 매커니즘의 최신화를 통한 정보 갱신	13
2) 실험을 통한 직업성 천식 관련 물질의 생체 독성 및 매커니즘 검증	13
2. 선행 연구 분석	13
1) 지난 연구 결과	13
2) 관련 AOP의 최신화	14
3. 제안된 AOP 관련 검증을 위한 실험 수행	14
1) 시험계 선정	14
2) 시험 물질 선정 및 노출 계획	16
3) 시험 시료 및 항목	18
4. 세부 연구 방법	19
1) Cytotoxicity 확인	19
2) ROS/RNS 측정	20
3) Cytokine 및 chemokine 측정	21
4) 조직병리학적 검사	26

Ⅲ.연구결과 27

1. 알러지성 호흡기질환 관련 AOP의 최신 연구 동향 29
2. 시험 물질에 의한 세포 독성 확인 30
3. 시험 물질에 의한 산화적 손상 지표 확인 32
4. 시험 물질에 의한 cytokine 및 chemokine 변화 34
5. 시험 물질에 의한 호흡기계의 조직병리학적 변화 42
 - 1) 일반 HE 염색을 통한 형태학적 변화 확인 42
 - 2) 특수 염색을 통한 점액 분비 확인 50

Ⅳ.고찰 59

1. AOP의 이용 및 전망 61
 - 1) AOP의 연구 방향 61
 - 2) 직업성 알러지성 호흡기 질환 관련 AOP 62



목 차

2. 호흡기계 연구에서의 대체 시험법 적용	62
1) 사람 장기 대체 연구의 개발	62
2) 호흡기 연구를 위한 대체 모델	64
3. 알러지성 호흡기 질환의 주요 이슈	65
4. 호흡기계 질환과 산화적 손상	66
5. 동물대체모델 시험의 AOP 적용의 제한점과 가능성	67
 V.결론	69
 참고문헌	73
 Abstract	81

표 목차

〈표 I-1〉 AOP의 주요 개념	6
〈표 I-2〉 면역성 호흡기 질환 물질 관련 게시된 AOPs	9
〈표 I-3〉 직업성 천식 관련 AOP 제안	10
〈표 II-1〉 직업성 천식 제안 AOP 세부 사항	14
〈표 II-2〉 사람 호흡기 세포를 이용한 3D-cell model 종류	15
〈표 II-3〉 시험 물질 정보	16
〈표 II-4〉 3D-cell model을 이용한 화학물질의 실험군 구성	17
〈표 II-5〉 분석 항목 및 분석 범위	23
〈표 II-6〉 Luminex 시스템을 이용한 시험 방법(Panel 1)	24
〈표 II-7〉 Luminex 시스템을 이용한 시험 방법(Panel 2,3)	25
〈표 III-1〉 알러지성 호흡기 질환 관련 AOP의 변동 사항	29
〈표 III-2〉 MDI 노출에 의한 시간대 별 Cytokine 및 Chemokine 변화 (Mucilair™)	35
〈표 III-3〉 TDI 노출에 의한 시간대 별 Cytokine 및 Chemokine 변화 (Mucilair™)	36
〈표 III-4〉 TMA 노출에 의한 시간대 별 Cytokine 및 Chemokine 변화 (Mucilair™)	37
〈표 III-5〉 MDI 노출에 의한 시간대 별 Cytokine 및 Chemokine 변화 (Smalllair™)	38
〈표 III-6〉 TDI 노출에 의한 시간대 별 Cytokine 및 Chemokine 변화 (Smalllair™)	39

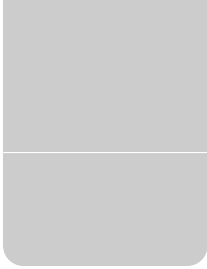


표 목차

〈표 III-7〉 TMA 노출에 의한 시간대 별 Cytokine 및 Chemokine 변화 (Smalllair™)	40
〈표 III-8〉 MDI, TDI 및 TMA 노출에 의한 Cytokine 및 Chemokine 변화 (Smalllair™-asthma)	41

그림목차

[그림 II-1] 3D-cell model을 이용한 실험 설계 모식도	18
[그림 II-2] In vitro cytotoxicity detection assay 모식도	20
[그림 II-3] In vitro ROS/RNS assay 모식도	21
[그림 II-4] 비드를 이용한 분석기기의 원리	22
[그림 III-1] MDI, TDI 및 TMA 노출에 의한 호흡기계 3D-cell model의 시간대 별 세포 손상	31
[그림 III-2] MDI, TDI 및 TMA 노출에 의한 호흡기계 3D-cell model의 시간대 별 산화적 손상 지표	33
[그림 III-3] MDI에 의한 상부 호흡기계 3D-cell model의 시간대 별 형태학적 변화(x200)	43
[그림 III-4] MDI에 의한 하부 호흡기계 3D-cell model의 시간대 별 형태학적 변화(x200)	44
[그림 III-5] TDI에 의한 상부 호흡기계 3D-cell model의 시간대 별 형태학적 변화(x200)	45
[그림 III-6] TDI에 의한 하부 호흡기계 3D-cell model의 시간대 별 형태학적 변화(x200)	46
[그림 III-7] TMA에 의한 상부 호흡기계 3D-cell model의 시간대 별 형태학적 변화(x200)	47
[그림 III-8] TMA에 의한 하부 호흡기계 3D-cell model의 시간대 별 형태학적 변화(x200)	48

[그림 Ⅲ-9] MDI, TDI 및 TMA에 의한 천식 이환 하부 호흡기계 3D-cell model의 24시간 후 형태학적 변화(x200)	49
[그림 Ⅲ-10] MDI에 의한 상부 호흡기계 3D-cell model의 점액 생성 변화 (x200)	51
[그림 Ⅲ-11] MDI에 의한 하부 호흡기계 3D-cell model의 점액 생성 변화 (x200)	52
[그림 Ⅲ-12] TDI에 의한 상부 호흡기계 3D-cell model의 점액 생성 변화 (x200)	53
[그림 Ⅲ-13] TDI에 의한 하부 호흡기계 3D-cell model의 점액 생성 변화 (x200)	54
[그림 Ⅲ-14] TMA에 의한 상부 호흡기계 3D-cell model의 점액 생성 변화 (x200)	55
[그림 Ⅲ-15] TMA에 의한 하부 호흡기계 3D-cell model의 점액 생성 변화 (x200)	56
[그림 Ⅲ-16] MDI, TDI 및 TMA에 의한 천식 이환 하부 호흡기계 3D-cell model의 24시간 후 점액 생성 변화(x200)	57

I. 서론

.....

I. 서론

1. 화학물질 등의 독성시험 방향 전환

1) 대체 시험법의 개발

- 최근 화학물질 관련 규제 강화와 더불어 유럽의 REACH 및 한국의 화학물질의 등록 및 평가 등에 관한 법률과 생활화학제품 및 살생물제의 안전관리에 관한 법률이 도입되며 국내에서도 작업중 노출될 수 있는 유해화학물질 뿐만 아니라 일반 생활속에서 밀접하게 사용될 수 있는 생활환경제품 등에 대한 빠른 검증이 필요하게 되었다. 그러나 기존의 전통적인 독성 시험들은 자본 및 시간이 많이 소요되어 매년 새롭게 개발되는 신규화학물질 등에 대한 독성을 평가하기에 부족함이 있다.
- 또한 국내의 의약품, 화장품 또는 화학물질에 의한 독성을 검증하려는 목적으로 실시되는 동물실험에 대해 실험 동물의 복지 증진 및 효율성을 목적으로 대체시험 연구가 대안으로 제시되며 지속적으로 추진중에 있다. 현재 국내의 화장품 개발 분야는 완벽하게 동물실험을 대체한 것으로 알려져 있고, 기존 동물실험을 대신하여 피부감작성, 광독성, 피부자극성, 단회투여독성, 생체 외 피부흡수, 안점막 자극 시험 등이 수행되고 있다. 또한 피부감작성 시험 및 안자극 시험과 관련된 대체시험법이 OECD에 추가 등록되었다(조은상 외., 2020).

2) 대체 시험법에서 주목받는 새로운 개념 : AOP

- 최근의 대체시험은 NAMs(New Approach Methodologies)라는 용어로 설명할 수 있다. NAMs는 동물을 이용하지 않는 실험 방법과 기술의 개발, 개념적 접근 및 결합을 통한 화학물질의 유해성과 위해성 평가가 가능하게 해 준다(Kavlock et al., 2018). NAMs를 통해 현재 신체 각 세포 및 장기의 동물 대체모델이 개발되고 있으며, 간, 신장, 기도, 폐, 신경계, 생식기계 연구를 위한 다양한 2D 또는 3D 세포조합이 발표되었다.
- 이와 더불어 NAMs를 통해 개발된 시험법들을 증거가중치 방식의 접근 (Weight of Evidence), 컴퓨터를 이용한 예측 모델, 독성발현경로 (Adverse Outcome Pathway, AOP) 등의 다양한 도구를 통해 개념적 접근 및 방식 간의 결합을 통해 정보의 정확성을 높이고 다양한 방식으로 활용 가능할 수 있도록 개발이 진행되고 있다.
- 이러한 독성시험 패러다임의 전환 결과로, 특히 국제적으로 OECD나 미국, 유럽 등지에서 화학물질의 규제적 측면 및 독성과 관련된 예측분야에 활용할 수 있는 주요한 개념으로 제시된 AOP는 화학 물질이 생체에 영향을 미치는 단계별 과정의 정보를 취합하여 이를 구조적으로 연결하여 일종의 지도를 작성하는 개념으로, in vitro, in vivo 및 in silico 등의 결과로 생산된 데이터를 해석하고 그 결과를 최종적으로 규제에 적용 및 활용하기 위한 연구이다. 즉, 특정 화학물질이 유발하는 분자 수준의 변화부터 환경 및 사람의 건강에 영향을 주는 위해 결과까지 일련의 생물학적인 과정을 제시하는 개념적인 방법이라 할 수 있다.
- AOP는 화학물질의 체내 노출 이후 최종적으로 개인(또는 집단)에게 미치는 영향까지 각 단계별 발생하는 독성학적 영향을 경로를 연결하며 순차적으로 탐색해가는 방식이다. 즉 유입 후 생체 내에서 반응을 시작하는 분자수준 초기현상(MIE, Molecular Initiating Event)으로 시작해 각 영향 단계를 나타내는 주요현상(KE, Key Event)이 존재하며, 각 주

요현상은 최종적으로 악영향(AO, Adverse Outcome)으로 표현된다. 또한 각 주요현상은 서로 영향을 미치는 관계의 정도에 따라 주요현상관계(KER, Key Event Relationship)로 정렬될 수 있으며, 이에 속하는 각 현상은 DNA 결합, 단백질의 산화, 각 수용체 및 리간드의 결합 등 신체와의 초기 상호작용에서부터 유전자 및 단백질, 조직 수준에서 일어나는 변화 및 유전자의 활성/비활성, 세포 내 화학적 변화, 조직 내 구조적 변화 등을 포함하여 다양하게 표현될 수 있다(조은상, 2020).

- AOP는 각각 다른 주제로 이뤄진 기존의 in vitro 또는 in silico 시험의 결과들을 조합해 최종적으로 가중치 적용등을 통해 위해성 평가에 활용할 수 있도록 하여 동물대체시험법의 활용을 극대화 시킬 수 있다.
- 또한 AOP는 상향식 접근 방법을 통해 in chemico나 in vitro 수준에서 연구된 분자 생물학적 변화가 in vivo 수준에서 나타나는 변화와 연동될 수 있음을 시사하며, 다른 방식에서 제안된 MIE와 KE를 통해 AO를 예측하는 방식으로 활용될 수도 있다. 이러한 방식의 연구를 통해 화학물질의 위해성 관련 평가에서 동물실험의 사용을 절대적으로 줄일 수 있으며, 화학물질에 대한 생물학적 정보 수집의 주요필드를 동물을 사용하지 않는 in silico 또는 in vitro로 변화시킬 수 있다는 점에서 동물대체실험을 위한 주요한 도구로 이용할 수 있다(조은상, 2020). 아래 표에서 AOP에 이용되는 주요 개념을 간략하게 설명하였다.

〈표 I-1〉 AOP의 주요 개념

용어 (약어)	내용
Molecular Initiating Event (MIE, 분자수준 초기현상)	A specialized type of key event that represents the initial point of chemical interaction on molecular level within the organism that results in a perturbation that starts the AOP
Key Event (KE, 주요 현상)	A change in biological state that is both measurable and essential to the progression of a defined biological perturbation leading to a specific adverse outcome
Adverse Outcome (AO, 악영향)	A specialized type of key event that is generally accepted as being of regulatory significance on the basis of correspondence to an established protection goal or equivalence to an apical endpoint in an accepted regulatory guideline toxicity test
Key Event Relationship (KER, 주요 현상관계)	A scientifically-based relationship that connects one key event to another, defines a directed relationship between the two and facilitates inference or extrapolation of the state of the downstream key event from the known, measured, or predicted state of the upstream key event

출처 : OECD, User's handbook supplement to the guidance document for developing and assessing adverse outcome pathways(2018); 조은상 외. 화학물질에 의한 면역성 질환의 AOP 적용 연구(2020)

2. 화학물질과 직업성 천식

1) 직업성 천식의 종류 및 고려 사항

- 작업장 또는 작업과정의 원인으로 인해 발생하는 직업성 폐질환 중 직업성 천식은 호흡곤란, 흉부 압박감, 기침 증상 등의 임상적 증상으로 인해 증상이 심할 경우 수면 장애까지 유발될 수 있으며 반복적 증상 발현이 원인이 되어 정신적으로 부정적인 영향을 미칠 수 있는 질환이다.
- 천식 중 흔히 이야기되는 직업성 천식(occupational asthma, OA)은 감작성과 자극제와 연관되는 경우를 모두 포함하는 개념으로, 감작성 천식(hypersensitivity-induced OA)은 보편적으로 체내 IgE의 상승 및 비만세포의 탈과립 등을 원인으로 한다. 그리고 작업 악화성 천식(work-exacerbated asthma)은 근로자가 이미 천식에 이환된 상태에서, 작업 중 요인(분진, 가스, 증기 등)에 의해 천식이 악화된 경우를 말하며, 작업 중 자극성 있는 물질의 노출로 인해 천식이 유발된 경우는 자극제 관련 천식(irritant-induced OA)이라 분류할 수 있다(Burge et al., 2012).
- 직업성 천식의 진단을 위해 폐기능검사, 최대호기유속연속측정 및 기관지수축유발시험 등이 이용되는데, 조기 진단의 어려움 및 객관적인 질병 입증이 어려운 실정이지만, 질환 특성으로 인해 빠른 진단이 이뤄져야 증상의 악화를 막을 수 있다(조은상 외., 2020).

2) 직업성 천식의 주요 유발 물질

- 2020년 수행한 연구과제를 통해 직업병과 관련된 천식 유발물질을 탐색하였으며 Haz-Map, CNESST 및 CTD base를 통해 공통적으로 탐색된 원인 물질의 주요 카테고리는 무수화물류(Anhydrides), 아민류, 금속 및 금속화합물, 디이소시아네이트 및 혼합물, 식물/동물/곤충 등 생물유래 물질, 살생/살균/살충제, 염료 등으로 조사되었다. 또한 해당 물질에 노출된 가능성이 높은 업종으로 농장, 식물/동물(곤충 포함)/균류의 재배 및 가공 관련 공정, 플라스틱(석유화학제품류)의 성형/제조 공정, 미용업, 가죽태닝 등 염료이용 공정, 살충/살생제 제조 및 사용 공정, 금속 관련 공정 등이 탐색되었다(조은상 외., 2020).

3. AOP를 통해 분석된 직업성 알러지성 호흡기 질환

1) 직업성 천식 유발 화학물질과 AOP 연동 조사

기존 수행한 연구 과제를 통해, 직업성 천식을 유발하는 것으로 알려진 화학물질들에 대해 현재 게시중인 AOPs를 연동하여, 각 AOP에 대한 MIE, KE 및 AO를 함께 조사하였다. 해당 AOP 는 당시 총 18종으로 조사되었고, 해당 물질들은 호흡기 질환 의외 간질환 등과 주로 관련된 것으로 타났다. 해당 AOP의 목록은 표로 간략하게 표시하였다(조은상 외., 2020).

2) 천식 관련 AOP 조사

지난 연구과제 수행 시점에서 AOP wiki에 게시된 AOP 중 천식과 명확한 관련이 있는 AOP는 1건으로(AOP39), 해당 AOP는 제내 유입된 화학물질이 라이신-기(Lysine residue) 단백질 공유 결합을 유발하여 염증성 사이토카인 및 케모카인 등을 활성화시키고 이에 따라 수지상세포 및 T-림프구가 활성화

된다고 설명하고 있다. 최종적으로 호흡기 내 민감 반응을(Hypersensitivity response) 증가시킴으로써 천식의 주요 임상 증상인 기침, 호흡곤란 등의 임상 증상을 유발한다고 설명한다(조은상 외., 2020).

〈표 I -2〉 면역성 호흡기 질환 물질 관련 게시된 AOPs

AOP	Title
16	Acetylcholinesterase inhibition leading to acute mortality
36	Peroxisomal Fatty Acid Beta-Oxidation Inhibition Leading to Steatosis
43	Disruption of VEGFR Signaling Leading to Developmental Defects
58	NR1I3 (CAR) suppression leading to hepatic steatosis
60	NR1I2 (Pregnane X Receptor, PXR) activation leading to hepatic steatosis
61	NFE2L2/FXR activation leading to hepatic steatosis
66	Modulation of Adult Leydig Cell Function Subsequent Glucocorticoid Activation in the Fetal Testis
103	Cyclooxygenase inhibition leading to reproductive dysfunction via interference with spindle assembly checkpoint
107	Constitutive androstane receptor activation leading to hepatocellular adenomas and carcinomas in the mouse and the rat
124	HMG-CoA reductase inhibition leading to decreased fertility
150	Aryl hydrocarbon receptor activation leading to early life stage mortality, via reduced VEGF
153	Aromatase Inhibition leading to Ovulation Inhibition and Decreased Fertility in Female Rats
163	PPARgamma activation leading to sarcomas in rats, mice, and hamsters
175	Thyropoxidase inhibition leading to altered amphibian metamorphosis
177	Cyclooxygenase 1 (COX1) inhibition leading to renal failure and mortality
187	Anticoagulant rodenticide inhibition of vitamin K epoxide reductase resulting coagulopathy and hemorrhage
195	5-hydroxytryptamine transporter (5-HTT) inhibition leading to population increase
200	Estrogen receptor activation leading to breast cancer

출처 : OECD, AOP wiki(URL: <https://aopwiki.org/aops?direction=asc&sort=id>); 조은상 외. 화학물질에 의한 면역성 질환의 AOP 적용 연구(2020)

3) 추가 AOP 제안

데이터베이스로 나타난 직업성 천식 유발물질에 의한 KE가 현재 개발중인 AOP 에 명확하게 나타나지 않아 주요 화학물질 별 문헌 조사를 통해 관련된 KE 및 AO를 조사하였으며, 이를 기반으로 주요 화학물질에 적용될 것으로 예상되는 직업성 천식관련 AOP를 수정 및 제안하였다.

〈표 I-3〉 직업성 천식 관련 AOP 제안

AOP	제목
1	Cell surface protein binding chemicals leading to Th17-mediated neutrophilic asthma
2	ROS induced pulmonary inflammation leading to asthma

출처 : 조은상 외. 화학물질에 의한 면역성 질환의 AOP 적용 연구(2020)

4. 연구 목적

1) AOP 관련 후속 연구 진행

2020년 기 수행한 “화학물질에 의한 면역성 질환의 AOP 적용 연구”를 통해 직업성 알러지성 호흡기질환에 적용할 수 있는 AOP 지도 경로 및 초기 진단을 위한 유용한 마커를 탐색하였다.

2) 실험적 탐색을 통한 AOP 관련 지표 제시

제안된 AOP 및 마커를 실제 천식질환에 적용하기 위해서 실질적인 실험 검증 연구가 필요한 상황으로, 이번 연구 과제를 수행함으로써 실험 연구를 통해 제안된 AOP 및 마커(KE)의 유용성을 검증하여, 질환 관련 지표를 실험적으로 탐색 및 제시하려고 하였다.

Ⅱ. 연구방법

.....

II. 연구방법

1. 연구 범위

1) AOP 관련 분자적 매커니즘의 최신화를 통한 정보 갱신

- OECD AOP wiki를 통해 천식 관련 AOP의 추가 또는 수정된 정보를 갱신하여 최신화 유지
- 문헌 검색을 통한 직업성 천식과 화학 물질 간의 연계점 탐색 및 최신 정보 탐색

2) 실험을 통한 직업성 천식 관련 물질의 생체 독성 및 매커니즘 검증

- 인체 호흡기 세포를 이용한 실험적 탐색을 통해 천식 관련 단백질의 확인 및 정량 분석 연구
- AOP 관련 매커니즘 검증을 통해 직업성 천식 관련 초기 진단 가능성이 높은 마커 제시 및 적용 방안 탐색

2. 선행 연구 분석

1) 지난 연구 결과

직업성 천식 관련 주요 유발 물질을 고려하여 기존 AOP의 보완 및 신규 AOP 각 1건 제안을 완료하였으나 제안된 AOP 내 각 KE 에 대한 실험적 검증이 요구되었다. 기존 연구 과제를 통해 제안된 AOP 내 확인이 필요한 주요 KE를 표로 나타내었다.

〈표 II-1〉 직업성 천식 제안 AOP 세부 사항

AOP	AOP	MIE/KE
1	Cell surface protein binding chemicals leading to Th17-mediated neutrophilic asthma	- Bind to cell surface proteins - Increased HIF-α expression - Inflammation, neutrophil-driven, Th17-mediated - Increased, expression of IL-17
2	ROS induced pulmonary inflammation leading to asthma	- Increase, Reactive oxygen species production - Increased production of pulmonary, pro-inflammatory cytokines - Increased serum IgE

2) 관련 AOP의 최신화

AOP wiki 또는 웹 검색을 통해 획득한 문헌 탐색을 통해 천식, 폐질환, 및 면역성 질환 관련 최신 연구 정보를 갱신하였다, 또한 폐질환 및 천식 관련 개발중인 AOP 와 KE의 업데이트 사항을 확인하였다.

3. 제안된 AOP 관련 검증을 위한 실험 수행

특정 화학물질에 의한 체내 영향 확인을 위하여 실제 사람의 호흡기 세포를 이용하여 3D로 구성된 세포 모델(human 3D-cultured respiratory epithelium)을 이용하여 실험을 수행하였다. 2020년 연구된 천식 유발 물질 및 바이오마커 조사를 통해 시험 화학물질을 선정 후 각 물질의 천식 관련 분자생물학적 지표를 조사하였다.

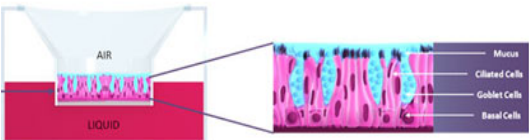
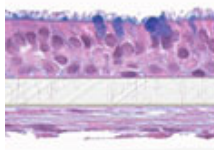
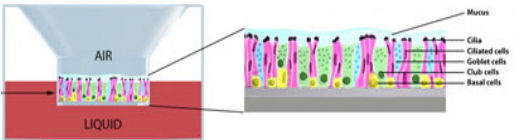
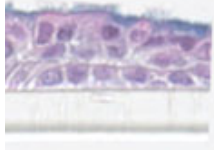
1) 시험계 선정

- 인체 세포를 이용한 시험을 위하여 1차원 또는 2차원 배양이 아닌 3차

원 배양을 통해 호흡기 상피의 직접적인 형태 및 기능적 특성을 재현할 수 있도록 Epithelix 사의 Mucilair™ 및 Smallair™ 세포주를 선택하였다. MucilAir™는 상부호흡기로 통칭되는 비강 또는 기관지에서 분리된 1차 인체 상피세포로 구성되어 있으며 인체 기도 상피의 완전한 대체를 위하여 개발된 3D 세포 배양 모델이다.

- MucilAir™는 분화된 ciliated epithelial cell(50~60%)과 goblet cell(10~20%) 및 basal cell(10~20%)로 구성되어 실제 인체 기관지 상피의 tight junction, 극성, 거짓중층상피를 재현한다. 또한 Smallair™는 인체의 low respiratory tract 연구를 위하여 재구성된 세포주로 Mucilair™와 다르게 club cell이 추가되어 있다. 또한 Smallair™-asthma는 천식 이환 환자의 호흡기계 세포를 이용하여 Smallair™과 동일한 방식으로 제작된 모델로 동일 물질에 대한 정상 인체 세포 모델과의 생체적 반응 차이를 확인하기 위하여 이용하였다.
- Mucilair™, Smallair™ 및 Smallair™-asthma 를 구성하는 해당 세포주의 종류 및 구성 세포의 모식도는 표로 나타내었으며, 각 세포주는 수령 후 안정화를 위해 3일~7일동안 전용 배양액을 사용하여 배지를 교환하여 유지하였다.

〈표 II-2〉 사람 호흡기 세포를 이용한 3D-cell model 종류

종류	세포 모식도	염색 사진
Mucilair™		
Smallair™ /Smallair™-asthma		

2) 시험 물질 선정 및 노출 계획

- 2020년 연구과제에서 조사되었던 저분자량 직업성 천식 유발물질 목록 중 작업장에서의 노출보고가 많은 디이소시아네이트(Diisocyanates) 및 무수물(anhydride)을 선택하였다. 이 중 메틸렌 다이페닐 다이아이소시아네이트(Methylene Diphenyl diisocyanate, MDI), 톨루엔 디이소시아네이트(Toluene diisocyanate, TDI) 및 트리멜리트산무수물(Trimellitic anhydride, TMA)을 시험 물질로 선정하였다. 각 시험 물질의 정보는 아래 표와 같다.

〈표 II-3〉 시험 물질 정보

연번	물질 이름 (CAS number)	구매처 (구매정보)	분자량 (g/mol)
1	4,4'-Methylenebis (phenyl isocyanate) (101-68-8)	Sigma-aldrich 256439-50G (St. Louis, USA)	250.25
2	Toluene diisocyanate (26471-62-5)	Merck 8.08264.0100 (Darmstadt, Germany)	172.2
3	Trimellitic Anhydride (552-30-7)	TCI C0046 (Tokyo, Japan)	192.13

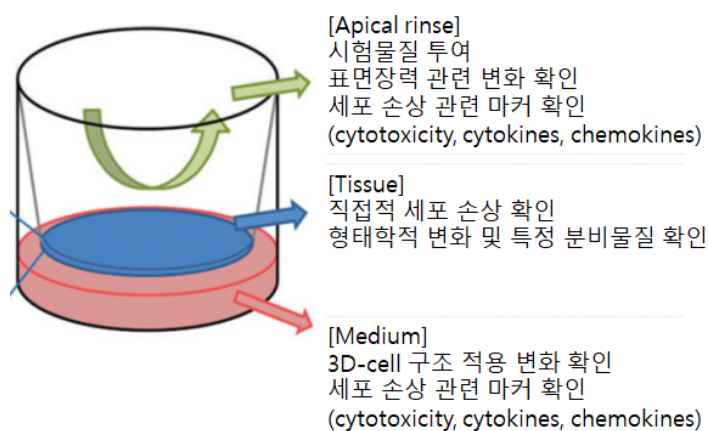
- 또한 문헌 조사를 통해 보고된 해당 물질의 IC50을 기준으로 저/중/고 농도를 설정하여 물질 노출 시간대 별 시험을 추진하였다. 각 화학물질의 시험 농도별 용액 제조를 위하여 최종 희석 농도에서 세포독성이 나타나지 않는 범위의 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 이용하여 용해시킨 후 세포배양액을 이용하여 희석하였다(최종 DMSO 농도 0.2%). 시험을 위한 군 구성은 표로 나타내었다.

〈표 II-4〉 3D-cell model을 이용한 화학물질의 실험군 구성

Mucilair™/ Smallair™	MDI		TDI		TMA	
	24 시간	48 시간	24 시간	48 시간	24 시간	48 시간
대조군 (NC)	0	0	0	0	0	0
저농도 (low)	30 uM	30 uM	0.2 mM	0.2 mM	10 uM	10 uM
중농도 (mid)	100 uM	100 uM	1 mM	1 mM	100 uM	100 uM
고농도 (high)	300 uM	300 uM	5 mM	5 mM	250 uM	250 uM
Smallair™ -asthma	MDI		TDI		TMA	
	24 hr		24 시간		24 시간	
대조군 (NC)	0 uM		0 mM		0 uM	
저농도 (low)	10 uM		0.2 mM		5 uM	
중농도 (mid)	30 uM		1 mM		100 uM	
고농도 (high)	100 uM		5 mM		500 uM	

3) 시험 시료 및 항목

시험물질 투여 24 또는 48시간 후 세포 손상 및 시험 물질에 의한 천식 관련 지표들의 변화를 확인하기 위하여 세포 독성, 형태학적 변화, 염증 관련 cytokine의 변화량 및 산화적 손상과 관련된 ROS 측정을 위하여 세포 상층액 및 세포 단면을 채취하여 실험에 이용하였다. 시험에 이용된 well의 모식도 및 사용한 시료의 종류를 그림으로 나타내었다. (상층액 및 세포배양액은 통합하여 사용)

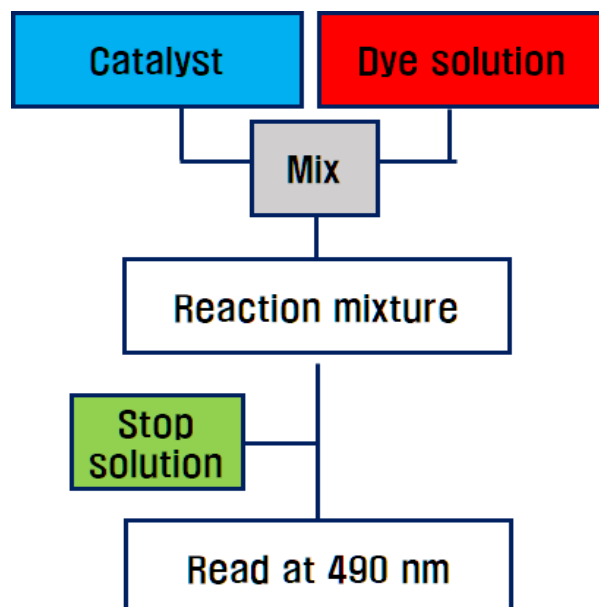


[그림 II-1] 3D-cell model을 이용한 실험 설계 모식도

4. 세부 연구 방법

1) Cytotoxicity 확인

- 세포 독성은 채취된 상층액에서 LDH (lactate dehydrogenase) 활성 분석을 통해 세포 누출 손상 결과를 확인하였다.
- 실험의 주요 원리로 이용되는 LDH는 세포질에 존재하는 효소로 통상적으로 세포막을 통과하지 않으나 세포막 손상시 세포밖으로 누출된다. 또한 LDH는 젖산의 탈수소화에 촉매로 작용하여 pyruvate와 NADH를 생성하는데, 이후 NADH는 촉매(diaphorase)에 의해 tetrazolium salt INT을 환원시켜 490 nm의 흡수를 갖는 적색의 formazan 색소를 형성한다. 따라서, LDH 활성을 490 nm의 흡광도의 증대로 측정하는 원리이다.
- 실험은 제조업체(Cytotoxicity Detection Kit, Roche, Basel, Switzerland)의 매뉴얼에 따라 수행 후 Biotek Synergy HT (BioTek, VT, USA) 마이크로플레이트 판독기를 이용하여 값을 계산하였다. 결과값은 37℃ 배양 배지에서 1% v/v Triton X-100에 1시간 동안 노출 시킨 양성 대조군 및 대조군에서 얻은 값에 상대적인 세포독성 백분율로 표시하였으며, 실험의 과정은 그림을 통해 간략하게 표시하였다.



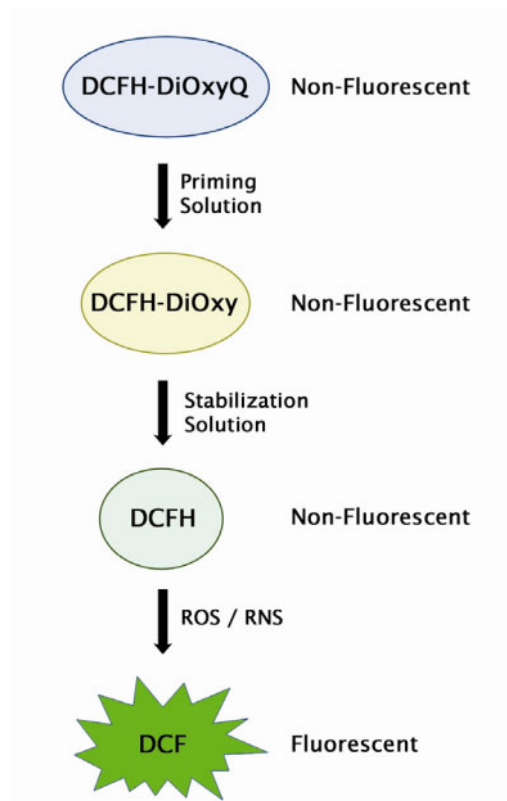
[그림 II-2] In vitro cytotoxicity detection assay 모식도

2) ROS/RNS 측정

- Total ROS/RNS 활성산소 활성도를 측정하기 위해 OxiSelect™ In Vitro ROS/RNS Assay Kit (Cell biolabs Inc., CA, USA)를 이용하여 실험을 수행하였다. 이 방식은 불소 유발 프로브 2',7'-디클로로디하이드로 플루오레스스킨 DiOxyQ(DCFH-DiOxyQ)의 사용을 기반으로 하며, 세포질에서 프로브는 비형광 2',7'-디클로로디하이드로플루오르신 (DCFH)으로 탈아세틸화된다. DCFH는 형광 제품 2',7'-디클로로디하이드로플루오르세인(DCF)의 형성과 함께 ROS 및 반응성 질소 종(RNS) (예: H₂O₂, RO•, NO, ONOO-)과 반응하여, DCF 형광 강도 (docex=docnm, λ_{em}=530nm)는 생물학적 샘플의 ROS/RNS 양에 비례해 발색된다.
- ROS/RNS의 양은 PBS의 DCF 표준용액을 기준으로 검정곡선으로 계산하였다. 측정은 Biotek Synergy HT (BioTek, VT, USA) 마이크로플레

이트 판독기에서 수행되었으며, 각 well의 상층액을 100 uL씩 채취하고 PBS를 사용하여 예비실험을 통해 확인한 최대발색농도 범위의 안에 들도록 2배 희석하여 사용하였다.

- 해당 키트를 이용해 진행된 실험의 원리를 모식도로 표시하였다(Cell biolabs Inc.).

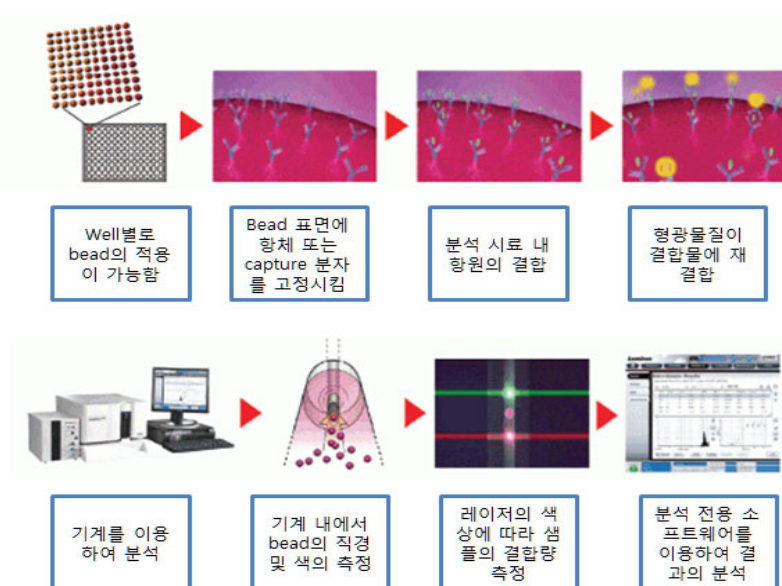


[그림 II-3] In vitro ROS/RNS assay 모식도

3) Cytokine 및 chemokine 측정

- 루미넥스 분석 시스템(Luminex 200 system, LX200-XPON3.1, Luminex Corporate, Austin, USA)을 이용하여 세포배양액 내 cytokine 및 chemokine을 분석하였다.

- 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 이용하여 이뤄지며, 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 및 측정할 수 있다. 이러한 방식을 통해 특정 bead에 특정 항체를 붙여 시료와 한꺼번에 반응 시키고 기기에서 읽을 때 bead 번호와 bead 표면에서의 분석물질의 반응 정도를 측정하는 원리이다.
- 이러한 방식으로 특징적으로 적은양의 시료에서 다양한 분석을 수행할 수 있는 방법이며, 대략적인 분석의 원리는 간략하게 모식도로 나타내었다. (조은상 외., 2017; Luminex corporate)



[그림 II-4] 비드를 이용한 분석기기의 원리

- 또한 Luminex 전용으로 제공되는 Panel의 구성에 따라 연구하고자 하는 cytokine 및 chemokine을 3그룹으로 나눠 각 시료 당 3회의 실험을 진행하였으며, 시료는 2배 희석하여 이용하였다.

〈표 II-5〉 분석 항목 및 분석 범위

Panel	분석 Target	Standard curve range(pg/mL)
1	CCL2/JE/MCP-1	30.9 - 7500
	IL-1 beta/IL-1F2	17.7 - 4300
	IL-4	17.3 - 4200
	IL-6	4.53 - 1100
	IL-8/CXCL8	4.12 - 1000
	IL-13	453 - 110000
	IL-17/IL-17A	13.2 - 3200
	MMP-1	49.4 - 12000
	MMP-2	276 - 67000
	TNF-alpha	8.23 - 2000
2	TGF-beta 1	33.3 - 24,300
3	TGF-beta 2	17.0 - 12,500
	TGF-beta 3	68.0 - 49,850

- 시료의 분석은 Magnetic Luminex Assay kit (LXSARM/LTGM00, R&D system Inc., USA)를 이용하였다. 각 Panel에 따른 시험 방법은 제조사의 매뉴얼에 따라 수행하였으며 각 시험 방법은 아래 표와 같다.

〈표 II-6〉 Luminex 시스템을 이용한 시험 방법(Panel 1)

과정	시험 방법(LXSARM)
시료 및 시험 시약 준비	1. 시료 : 75 μL를 희석 없이 이용 2. Wash Buffer : 20 mL의 농축액을 증류수에 희석해 500 mL 제조 3. Standard : 농축액을 희석액을 이용해 희석함 4. Microparticle cocktail : 1000 xg로 30초간 원심분리 후 희석액을 이용해 10배 희석 5. Biotin antibody cocktail : 1000 xg로 30초간 원심분리 후 희석액을 이용해 10배 희석 6. Streptavidin-PE : 1000 xg로 30초간 원심분리 후 농축액 220 μL을 Wash buffer 5.35 mL에 희석
기기 설정	1. 50 events/bead로 설정 2. Flow rate : 60 μL/min 3. 샘플량 : 50μL 4. Doublet discriminator는 8000/16500으로 설정 5. MFI(Median Fluorescence Intensity) 취합
시험 과정	1. 시료 및 시약 준비 2. microparticle cocktail을 재부유시키고 50 μL씩 well에 분주 3. Standard 또는 희석 시료를 well에 넣고 실온에서 2시간 반응 4. Wash buffer를 이용하여 well을 2회 세척 5. 희석된 Biotin antibody cocktail을 50 μL씩 well에 넣고 실온에서 1시간 동안 반응 6. Wash buffer를 이용하여 well을 2회 세척 7. 희석된 Streptavidin-PE를 50μL씩 well에 넣고 실온에서 30분간 반응 8. Wash buffer를 이용하여 well을 2회 세척 9. Wash buffer를 100 μL 넣고 microparticle을 재 부유시킨 후 2분간 교반 10. 기기를 이용해 90분 이내 분석된 기기값을 기록
결과 분석	1. 리딩된 값에 대해 5-파라미터 분석을 실시 2. Standard의 비교를 통해 농도값을 계산

〈표 II-7〉 Luminex 시스템을 이용한 시험 방법(Panel 2,3)

과정	시험 방법(LTGM00)
시료 및 시험 시약 준비	1. 시료 : 세포배양액을 희석없이 사용 2. Wash Buffer : 농축액을 증류수에 10배 희석 3. Standard : 희석액을 이용해 희석 4. Antibody-immobilized bead에 30초간 초음파를 가하고 1분간 격렬하게 교반 5. 원액 150 uL와 Assay buffer를 이용해 총 3mL의 희석액 제조
기기 설정	1. 측정되는 각 분석 물질에 대해 미세 입자 영역 할당 2. 50 events/bead로 설정 3. 샘플량 : 100uL 4. Gate setting : 8,000/15,000 5. MFI(Median Fluorescence Intensity) 취합 설정
시험 과정	1. 시약 및 시료 준비 2. assay buffer를 각 well에 200 uL씩 분주 3. Standard 또는 희석 시료를 25 uL씩 분주 후 assay buffer를 동량 분주 4. bead를 각 well에 25 uL씩 분주 5. 냉장(2~8℃)에서 16~18시간 반응 6. Wash buffer를 이용하여 well을 3회 세척 7. 희석된 detection antibody를 50 uL씩 well에 넣고 실온, 1시간 반응 8. 희석된 Streptavidin-phycoerythrin을 50uL씩 well에 넣고 실온, 30분 반응 9. Wash buffer를 이용하여 well을 3회 세척 10. Sheath fluid 또는 drive fluid를 150 uL씩 well에 넣음 11. 기기를 이용해 90분 이내 분석된 기기값을 기록
결과 분석	1. 리딩된 값에 대해 분석 실시 2. Standard의 비교를 통해 농도값을 계산

4) 조직병리학적 검사

- 10% 중성포르말린 용액을 이용하여 3D 세포가 위치한 Tray 바닥면을 고정시킨 후 24 시간 후 고정된 조직을 Tray에서 분리하였다. 고정이 완료된 조직은 단면이 잘 보이도록 삭정해 카세트에 넣고 흐르는 물로 4시간 이상 수세하여 고정액을 제거했다. 조직전처리기 (Tissue processor, Leica, Germany)를 이용해 탈수 (Dehydration) - 청명(Clearing) - 침투 (Paraffin infiltration) 과정을 거쳐 포매기 (Tissue embedding center, Leica, Germany)에서 적당한 크기의 몰드를 이용해 파라핀 블록으로 만들었다.
- 미세박절기 (Tissue microtome, Leica, Germany)를 이용해 3~5 μm 의 두께로 파라핀블록을 얇게 잘라낸 후 박절된 파라핀 조각은 항온수조에 띄운 후 유리슬라이드에 올려 건조시킨 후, 염색을 위해 이용하였다.
- Hematoxylin 및 Eosin 염색 (HE stain)은 자동염색봉입기 (Automatic stainer, DAKO, Denmark) 및 전용 염색 시약(Dako hematoxylin, CS700; Dako Eosin, CS701; Dako mounting medium, CS703; DAKO, Denmark)을 이용하여 실시하였다.
- 시험 물질에 의해 자극된 호흡기계 세포의 점액 분비를 확인하기 위하여 특수염색을 실시하였다. Periodic Acid Schiff (PAS) stain kit(ab150680, Abcam, MA, USA)를 이용하여 자주색(magenta)으로 염색된 점액다당류 (mucopolysaccharides)를 확인하였다.
- 검경 및 형태학적 분석을 위해 카메라(DMC2900)가 부착된 광학현미경 (DM3000 LED, Germany) 및 사진프로그램(Leica Application Suite, V4.12)을 이용하였다.

Ⅲ. 연구결과

.....

III. 연구결과

1. 알러지성 호흡기질환 관련 AOP의 최신 연구 동향

- 기존 알러지성 천식 관련되어 조사하였던 AOP39의 일부 내용이 변화되었다. AO를 유발하는 첫 단계인 MIE를 변경함으로써 기존의 lysine residue로 한정되었던 공유결합의 범위를 확대하였다. 상세 변화 사항을 표로 정리하였다.

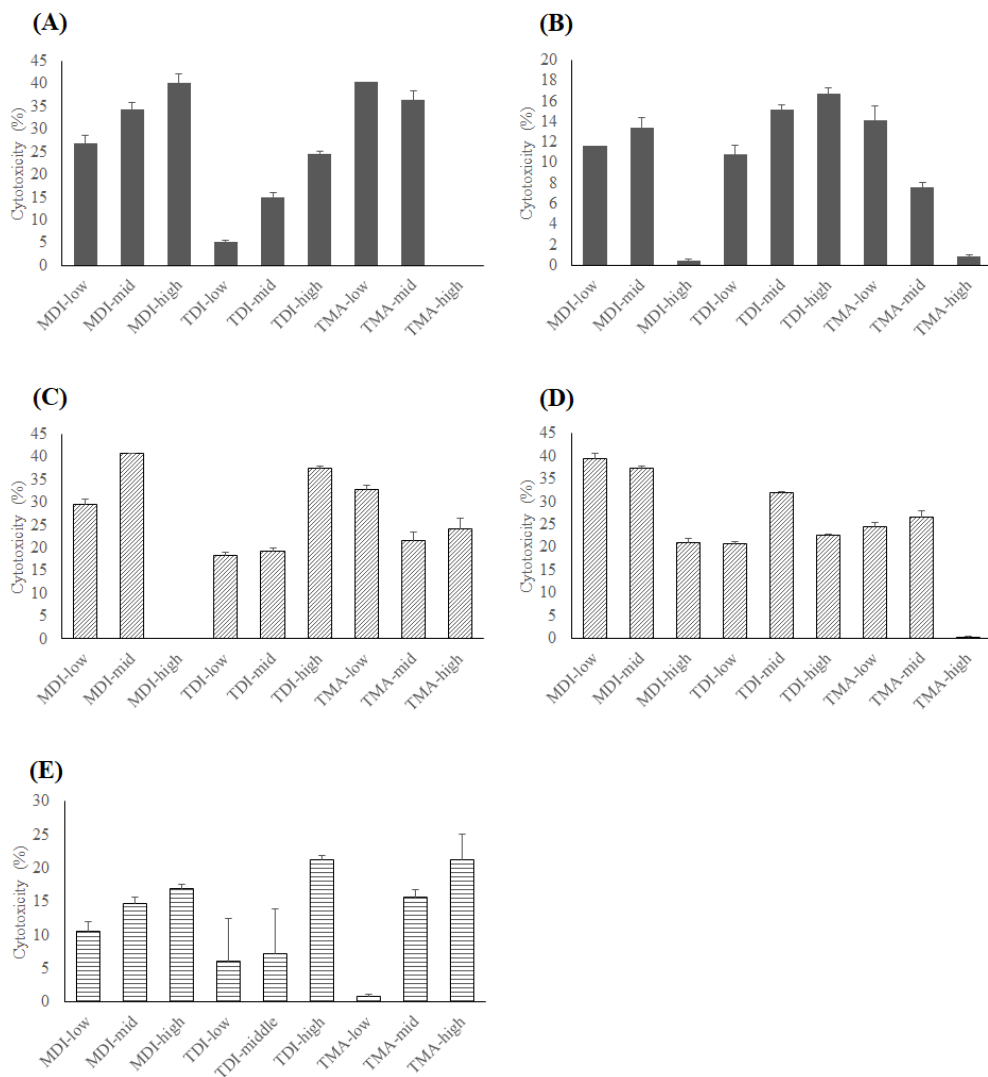
〈표 III-1〉 알러지성 호흡기 질환 관련 AOP의 변동 사항

AOP39	변동 전	변동 후
MIE	75 Covalent binding to protein, possibly lysine residue	396 Covalent Binding, Protein
KE	151 Activation, Inflammatory cytokines, chemokines, cytoprotective gene pathways 398 Activation, Dendritic Cells 272 Activation/Proliferation, T-cells	151 Activation, Inflammatory cytokines, chemokines, cytoprotective gene pathways 398 Activation, Dendritic Cells 272 Activation/Proliferation, T-cells
AO	313 Increase, Allergic Respiratory Hypersensitivity Response	313 Increase, Allergic Respiratory Hypersensitivity Response

2. 시험 물질에 의한 세포 독성 확인

각 시험물질의 농도 및 시간 별 노출에 따른 상부호흡기(Mucilair™) 및 하부호흡기(Smallair™, Smallair™-asthma)를 구성하는 세포들의 손상 여부를 확인하기 위하여, 시험물질 투여 24 또는 48시간 후 채취된 세포배양 상층액을 이용한 LDH (lactate dehydrogenase) 활성 분석을 통해 세포 누출 손상 결과를 확인하였다.

음성대조군 및 양성대조군의 차이를 이용하여 세포 손상을 계산한 결과 Mucilair™에서 각 물질 투여 24시간 후 세포 손상의 정도가 시험물질의 농도에 따라 증가하였으나, 48시간 이후는 MDI 및 TMA 투여군에서 최고 농도 투여군에서 정도가 감소하였다. Smallair™에서 TDI 투여군은 24 및 48시간 후 시험물질의 농도에 따라 손상이 증가하였으나 MDI 및 TMA는 농도에 따른 변화를 보이지 않았다. Smallair™-asthma에서 모든 시험물질 투여군에서 농도에 따라 손상이 증가하는 추세를 보였다.



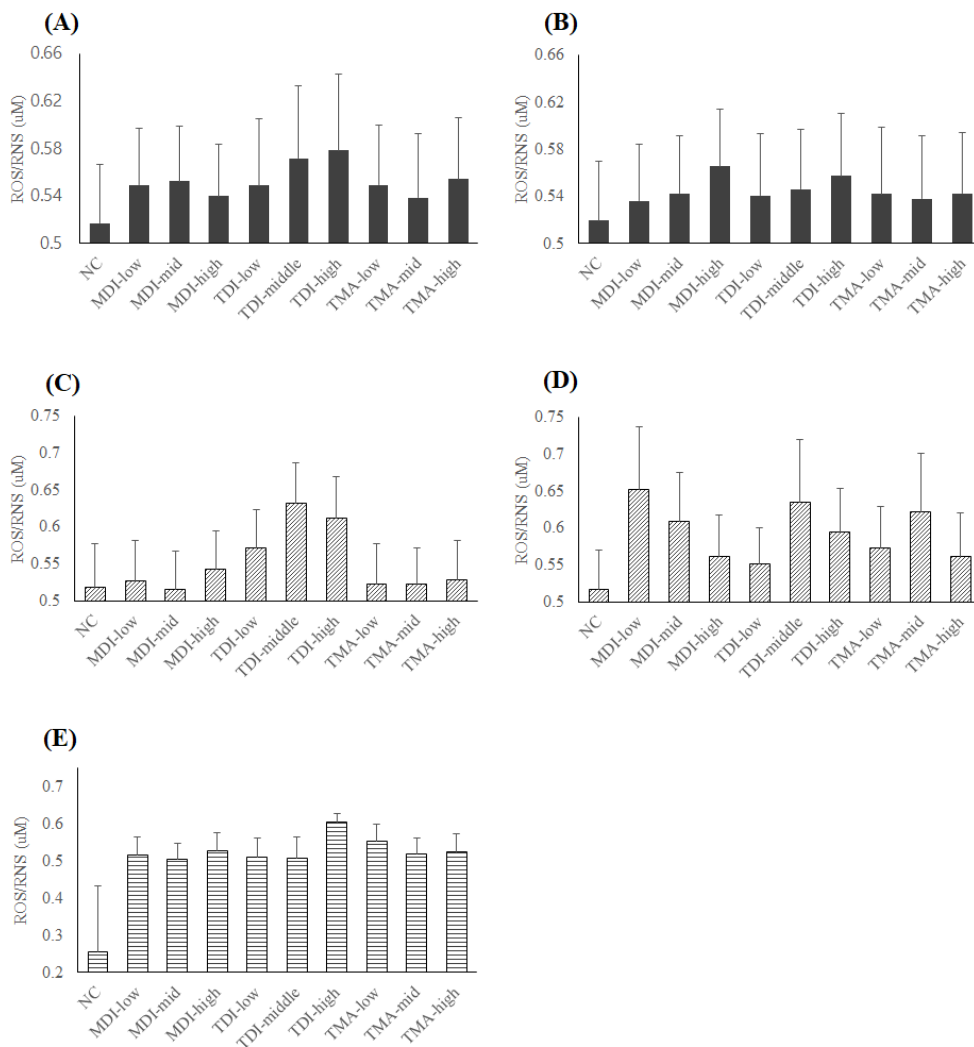
[그림 III-1] MDI, TDI 및 TMA 노출에 의한 호흡기계 3D-cell model의 시간대 별 세포 손상

(A) Mucilair™ 24 시간 노출; (B) Mucilair™ 48 시간 노출
 (C) Smallair™ 24 시간 노출; (D) Smallair™ 48 시간 노출
 (E) Smallair™-asthma 24 시간 노출

3. 시험 물질에 의한 산화적 손상 지표 확인

각 시험물질의 농도 및 시간별 노출에 따른 상부호흡기(Mucilair™) 및 하부호흡기(Smallair™, Smallair™-asthma)를 구성하는 세포주의 산화적 손상 관련 변화를 알아보기 위하여 시험물질 투여 24 또는 48시간 후 채취된 세포배양 상층액에서 존재하는 ROS/RNS 정도를 측정하였다.

Mucilair™에서 각 물질 투여 24시간 및 48시간 후 TDI의 경우 시험물질의 농도에 따라 ROS/RNS의 양이 증가하였고, MDI 및 TMA는 대조군에 비해 증가하였다. Smallair™에서 시험물질 투여 24시간 후 TDI의 경우 대조군에 비해 ROS/RNS의 양이 증가하였고 48시간 후 시험물질의 농도에 따라 변화하지 않았지만, 모든 물질에서 대조군에 비해 증가하였다. Smallair™-asthma에서 모든 시험물질 투여군에서 대조군에 비해 ROS/RNS의 양이 증가하였다.



[그림 III-2] MDI, TDI 및 TMA 노출에 의한 호흡기계 3D-cell model의 시간대
별 산화적 손상 지표

(A) Mucilair™ 24 시간 노출; (B) Mucilair™ 48 시간 노출

(C) Smallair™ 24 시간 노출; (D) Smallair™ 48 시간 노출

(E) Smallair™-asthma 24 시간 노출

4. 시험 물질에 의한 cytokine 및 chemokine 변화

각 시험물질의 농도 및 시간별 노출에 따른 상부호흡기(Mucilair) 및 하부 호흡기(Smallair)를 구성하는 세포주의 염증관련 지표를 알아보기 위해 다양한 종류의 cytokine 및 chemokine 정도를 측정하였다.

Mucilair™, Smallair™에서 각 시험물질 노출에 의해 cytokine 및 chemokine의 특정할 만한 변화는 보이지 않았다. Smallair™-asthma에서 정상인으로 구성된 동일 모델에 비해 MCP-1, IL-6, MMP-2, TNF-alpha, TGF-beta1, TGF-beta3가 감소하였고, IL-13이 증가하였다. 또한 Smallair™-asthma의 경우 MDI, TMA를 제외한 TDI 투여에 의해 MCP-1, IL-13, IL-4, IL-8, MMP-1, MMP-2, TNF-alpha, TGF-beta2, TGF-beta1 등의 cytokine 및 chemokine 수치의 감소가 확인되었다.

〈표 III-2〉 MDI 노출에 의한 시간대 별 Cytokine 및 Chemokine 변화(Mucilair™)

MucilAir™	24 시간 노출				48 시간 노출			
	NC	MDI -low	MDI -mid	MDI -high	NC	MDI -low	MDI -mid	MDI -high
CCL2 /MCP-1	16705.2 ± 432.9	15244.4 ± 355.1	18130.1 ± 3818.8	15761.1 ± 429.6	8208.8 ± 377.1	14859.3 ± 2913.1	13944.3 ± 368.1	12000.6 ± 1088.5
IL-1beta /IL-1F2	8.6 ± 4.1	5.5 ± 4.6	6.9 ± 6.6	12.9 ± 1.9	5.7 ± 0.0	5.6 ± 2.3	4.7 ± 3.6	0.0 ± 0.0
IL-13	359.7 ± 37.6	305.3 ± 0.0	411.4 ± 35.6	359.7 ± 37.6	303.1 ± 80.5	359.7 ± 37.6	384.9 ± 73.2	245.4 ± 43.8
IL-17 /IL-17A	14.1 ± 1.8	16.6 ± 1.8	15.4 ± 3.6	12.8 ± 3.6	12.8 ± 0.0	16.0 ± 2.7	15.4 ± 0.0	10.3 ± 0.0
IL-4	101.7 ± 10.1	94.6 ± 4.2	100.4 ± 4.1	101.8 ± 6.1	94.4 ± 12.6	106.1 ± 4.0	101.8 ± 6.1	88.3 ± 13.1
IL-6	1178.0 ± 30.4	368.8 ± 2.7	517.1 ± 8.4	870.6 ± 13.8	307.1 ± 1.0	663.5 ± 76.4	1078.7 ± 47.8	290.2 ± 4.4
IL-8 /CXCL8	9530.2 ± 365.1	9875.1 ± 207.4	10304.7 ± 54.4	10164.8 ± 474.5	9580.3 ± 120.6	10278.6 ± 120.4	9496.4 ± 466.0	8896.4 ± 118.4
MMP-1	4289.3 ± 184.4	3864.1 ± 84.8	3388.6 ± 100.1	4325.7 ± 15.7	3609.6 ± 38.1	3179.1 ± 285.4	3757.7 ± 83.6	1259.8 ± 10.8
MMP-2	52148.7 ± 1605.2	39201.9 ± 801.3	55281.6 ± 365.9	55704.1 ± 1442.9	90516.9 ± 2546.2	62276.1 ± 727.6	72616.6 ± 1196.0	62176.4 ± 633.4
TNF- alpha	18.9 ± 0.5	12.4 ± 1.5	14.4 ± 0.8	21.1 ± 0.5	9.9 ± 1.0	14.2 ± 2.0	15.3 ± 0.5	7.8 ± 0.0
TGF- bata2	764.1 ± 0.7	590.2 ± 4.1	675.9 ± 3.0	733.3 ± 14.8	80.3 ± 0.8	646.6 ± 1.5	676.7 ± 11.5	71.9 ± 1.6
TGF- beta1	2005.8 ± 15.5	1947.1 ± 26.0	2146.4 ± 38.7	2477.9 ± 56.0	278.5 ± 0.0	1947.1 ± 15.6	1895.6 ± 15.6	291.6 ± 6.1
TGF- beta3	40.7 ± 0.0	40.7 ± 0.0	49.9 ± 0.0	49.9 ± 0.0	8.3 ± 6.7	40.7 ± 0.0	31.6 ± 0.0	8.3 ± 6.7

〈표 III-3〉 TDI 노출에 의한 시간대 별 Cytokine 및 Chemokine 변화(Mucilair™)

MucilAir™	24 시간 노출				48 시간 노출			
	NC	TDI -low	TDI -mid	TDI -high	NC	TDI -low	TDI -mid	TDI -high
CCL2 /MCP-1	16705.2 ± 432.9	10808.2 ± 881.7	7195.4 ± 83.0	13320.7 ± 532.6	8208.8 ± 377.1	14664.5 ± 1139.2	12810.0 ± 1590.1	16362.7 ± 1645.4
IL-1beta /IL-1F2	8.6 ± 4.1	5.7 ± 2.5	8.7 ± 4.6	3.9 ± 2.5	5.7 ± 0.0	5.7 ± 2.5	3.9 ± 2.5	8.0 ± 1.0
IL-13	359.7 ± 37.6	331.3 ± 77.7	346.6 ± 19.1	333.1 ± 0.0	303.1 ± 80.5	331.3 ± 77.7	409.0 ± 107.3	373.2 ± 18.5
IL-17 /IL-17A	14.1 ± 1.8	11.5 ± 1.8	14.1 ± 1.8	16.6 ± 5.4	12.8 ± 0.0	16.0 ± 2.7	16.6 ± 9.0	16.6 ± 9.0
IL-4	101.7 ± 10.1	94.6 ± 4.2	82.2 ± 4.5	97.4 ± 8.3	94.4 ± 12.6	97.3 ± 12.4	101.7 ± 10.1	94.6 ± 4.2
IL-6	1178.0 ± 30.4	304.1 ± 19.0	142.4 ± 0.0	529.6 ± 6.6	307.1 ± 1.0	485.9 ± 0.4	1018.8 ± 79.4	642.7 ± 5.9
IL-8 /CXCL8	9530.2 ± 365.1	9936.6 ± 64.5	7544.3 ± 152.0	9481.0 ± 377.0	9580.3 ± 120.6	9448.3 ± 891.9	10198.7 ± 127.7	10157.1 ± 181.5
MMP-1	4289.3 ± 184.4	1585.6 ± 106.8	2936.6 ± 45.1	2722.3 ± 69.8	3609.6 ± 38.1	2759.6 ± 20.5	3266.3 ± 313.5	2907.7 ± 109.1
MMP-2	52148.7 ± 1605.2	54533.0 ± 1630.5	53396.1 ± 22.7	48155.7 ± 1292.9	90516.9 ± 2546.2	69080.4 ± 3804.9	65571.3 ± 1396.1	81746.2 ± 2091.0
TNF- alpha	18.9 ± 0.5	11.3 ± 1.0	6.2 ± 0.2	16.4 ± 1.0	9.9 ± 1.0	12.0 ± 0.0	18.4 ± 1.8	13.1 ± 1.5
TGF- bata2	764.1 ± 0.7	439.9 ± 0.7	52.3 ± 0.8	613.6 ± 3.7	80.3 ± 0.8	578.4 ± 4.5	680.1 ± 1.5	562.2 ± 2.2
TGF- beta1	2005.8 ± 15.5	1059.9 ± 16.4	194.6 ± 6.3	2082.6 ± 10.3	278.5 ± 0.0	1799.6 ± 26.1	1862.4 ± 0.0	1893.7 ± 2.6
TGF- beta3	40.7 ± 0.0	22.4 ± 0.0	10.7 ± 3.3	40.7 ± 0.0	8.3 ± 6.7	40.7 ± 0.0	40.7 ± 0.0	40.7 ± 0.0

〈표 III-4〉 TMA 노출에 의한 시간대 별 Cytokine 및 Chemokine 변화(Mucilair™)

MucilAir™	24 시간 노출				48 시간 노출			
	NC	TMA -low	TMA -mid	TMA -high	NC	TMA -low	TMA -mid	TMA -high
CCL2 /MCP-1	8208.8 ± 377.1	15900.0 ± 2420.4	16422.3 ± 299.6	7319.1 ± 1539.3	8208.8 ± 377.1	13716.8 ± 469.6	14008.9 ± 774.1	10365.3 ± 1760.1
IL-1beta /IL-1F2	5.7 ± 0.0	0.0 ± 0.0	8.0 ± 1.0	5.7 ± 0.0	5.7 ± 0.0	6.5 ± 1.1	2.2 ± 0.0	2.2 ± 0.0
IL-13	303.1 ± 80.5	359.7 ± 37.6	436.6 ± 0.0	356.5 ± 113.3	303.1 ± 80.5	386.2 ± 0.0	662.5 ± 0.0	245.4 ± 43.8
IL-17 /IL-17A	12.8 ± 0.0	16.6 ± 1.8	15.4 ± 3.6	18.5 ± 2.7	12.8 ± 0.0	18.5 ± 4.5	17.9 ± 0.0	20.4 ± 3.6
IL-4	94.4 ± 12.6	101.8 ± 6.1	100.4 ± 4.1	100.4 ± 4.1	94.4 ± 12.6	91.2 ± 17.2	97.4 ± 8.3	78.9 ± 9.3
IL-6	307.1 ± 1.0	439.9 ± 4.1	539.9 ± 1.6	106.3 ± 10.9	307.1 ± 1.0	647.7 ± 19.3	554.2 ± 1.0	324.8 ± 30.7
IL-8 /CXCL8	9580.3 ± 120.6	9623.4 ± 218.8	9554.1 ± 256.1	6779.2 ± 290.7	9580.3 ± 120.6	10068.3 ± 187.2	9960.0 ± 188.2	8938.6 ± 300.5
MMP-1	3609.6 ± 38.1	2832.4 ± 14.1	4759.3 ± 11.7	9259.9 ± 1001.0	3609.6 ± 38.1	3069.2 ± 30.4	2877.2 ± 40.6	1196.4 ± 137.2
MMP-2	90516.9 ± 2546.2	50408.6 ± 1915.4	67502.5 ± 2573.4	54744.4 ± 268.2	90516.9 ± 2546.2	68419.0 ± 1735.6	59887.2 ± 1820.1	61340.0 ± 666.5
TNF- alpha	9.9 ± 1.0	18.0 ± 1.8	17.1 ± 1.0	8.8 ± 0.5	9.9 ± 1.0	11.7 ± 0.5	11.7 ± 1.5	7.8 ± 0.0
TGF- bata2	80.3 ± 0.8	660.2 ± 14.8	671.4 ± 4.1	42.6 ± 1.6	80.3 ± 0.8	559.0 ± 12.6	427.2 ± 0.7	61.3 ± 0.8
TGF- beta1	278.5 ± 0.0	2199.2 ± 10.3	2057.0 ± 46.5	278.5 ± 12.3	278.5 ± 0.0	1734.8 ± 28.8	1129.3 ± 16.3	321.8 ± 12.1
TGF- beta3	8.3 ± 6.7	40.7 ± 0.0	40.7 ± 0.0	3.6 ± 0.0	8.3 ± 6.7	31.6 ± 0.0	22.4 ± 0.0	3.6 ± 0.0

〈표 III-5〉 MDI 노출에 의한 시간대 별 Cytokine 및 Chemokine 변화(Smallair™)

SmallAir™	24 시간 노출				48 시간 노출			
	NC	MDI -low	MDI -mid	MDI -high	NC	MDI -low	MDI -mid	MDI -high
CCL2 /MCP-1	19984.1 ± 178.3	21201.8 ± 2109.9	21820.7 ± 1221.2	6893.0 ± 194.3	12207.7 ± 256.5	22637.5 ± 2263.2	11631.0 ± 159.3	20893.1 ± 2613.6
IL-1beta /IL-1F2	7.2 ± 2.1	7.2 ± 2.1	14.2 ± 3.7	2.2 ± 0.0	6.9 ± 6.6	13.4 ± 6.5	15.5 ± 1.8	6.4 ± 3.3
IL-13	436.6 ± 0.0	472.9 ± 16.9	508.1 ± 32.9	333.1 ± 0.0	384.9 ± 73.2	436.6 ± 0.0	384.9 ± 73.2	359.7 ± 37.6
IL-17 /IL-17A	12.8 ± 3.6	21.7 ± 1.8	19.8 ± 2.7	15.4 ± 3.6	17.9 ± 3.6	13.5 ± 2.7	19.2 ± 3.6	15.4 ± 7.2
IL-4	105.9 ± 11.9	106.1 ± 4.0	118.2 ± 9.3	85.4 ± 0.0	99.0 ± 2.1	100.4 ± 4.1	107.5 ± 2.0	101.9 ± 2.0
IL-6	1890.2 ± 21.7	1498.8 ± 39.3	1299.7 ± 15.3	331.3 ± 3.7	565.4 ± 17.7	3103.1 ± 151.5	2312.5 ± 123.6	1787.8 ± 9.5
IL-8 /CXCL8	10511.0 ± 94.8	10650.3 ± 661.1	10852.1 ± 368.2	9464.7 ± 114.4	9822.5 ± 46.7	11400.5 ± 462.9	10539.8 ± 27.9	10899.8 ± 169.7
MMP-1	4161.1 ± 95.9	3919.0 ± 49.9	6611.1 ± 248.1	1148.1 ± 7.1	2974.3 ± 86.1	4013.7 ± 415.7	4077.6 ± 27.9	4387.6 ± 44.4
MMP-2	82698.0 ± 1699.1	81149.5 ± 970.7	85187.9 ± 2611.1	68463.0 ± 396.4	30759.1 ± 201.5	117734.8 ± 1859.1	77795.6 ± 2016.4	107839.3 ± 2469.7
TNF- alpha	28.5 ± 0.5	31.6 ± 0.3	51.7 ± 1.6	7.4 ± 0.5	23.7 ± 0.0	26.8 ± 1.8	55.3 ± 0.8	18.9 ± 0.5
TGF- bata2	277.7 ± 0.0	219.2 ± 5.3	266.5 ± 8.3	43.8 ± 0.0	371.1 ± 3.8	243.4 ± 1.5	311.4 ± 12.8	304.5 ± 7.6
TGF- beta1	2836.1 ± 5.0	2689.7 ± 10.1	3414.2 ± 151.5	360.2 ± 6.0	2290.0 ± 35.9	3127.1 ± 25.0	2521.1 ± 5.1	3231.3 ± 37.4
TGF- beta3	54.4 ± 6.4	58.9 ± 0.0	58.9 ± 0.0	8.3 ± 6.7	36.2 ± 6.5	68.0 ± 0.0	40.7 ± 0.0	58.9 ± 0.0

〈표 III-6〉 TDI 노출에 의한 시간대 별 Cytokine 및 Chemokine 변화(Smallair™)

SmallAir™	24 시간 노출				48 시간 노출			
	NC	TDI -low	TDI -mid	TDI -high	NC	TDI -low	TDI -mid	TDI -high
CCL2E /MCP-1	19984.1 ± 178.3	18130.0 ± 37.4	18830.1 ± 1418.5	16890.9 ± 269.0	12207.7 ± 256.5	10919.4 ± 949.1	17189.9 ± 109.7	15749.3 ± 478.7
IL-1beta /IL-1F2	7.2 ± 2.1	5.5 ± 4.6	8.7 ± 0.0	7.2 ± 2.1	6.9 ± 6.6	6.4 ± 3.3	3.9 ± 2.5	7.2 ± 2.1
IL-13	436.6 ± 0.0	411.7 ± 0.0	484.8 ± 0.0	386.2 ± 0.0	384.9 ± 73.2	345.8 ± 57.2	331.3 ± 77.7	435.5 ± 69.7
IL-17 /IL-17A	12.8 ± 3.6	16.6 ± 1.8	17.9 ± 7.2	17.9 ± 3.6	17.9 ± 3.6	14.1 ± 1.8	12.8 ± 3.6	21.1 ± 4.5
IL-4	105.9 ± 11.9	103.2 ± 8.0	114.3 ± 0.0	103.2 ± 8.0	99.0 ± 2.1	94.4 ± 12.6	96.1 ± 2.1	101.7 ± 10.1
IL-6	1890.2 ± 21.7	532.5 ± 46.3	1397.1 ± 28.4	989.7 ± 25.7	565.4 ± 17.7	291.9 ± 2.1	2182.9 ± 154.2	800.5 ± 12.0
IL-8 /CXCL8	10511.0 ± 94.8	10999.9 ± 90.8	10732.3 ± 251.3	10241.8 ± 155.4	9822.5 ± 46.7	10772.9 ± 347.2	10616.6 ± 216.5	10502.9 ± 41.7
MMP-1	4161.1 ± 95.9	3786.1 ± 370.0	7498.3 ± 271.3	3396.9 ± 64.5	2974.3 ± 86.1	3421.5 ± 64.6	3369.3 ± 325.9	3740.4 ± 140.3
MMP-2	82698.0 ± 1699.1	48330.0 ± 1617.1	74995.1 ± 560.3	56606.7 ± 453.8	30759.1 ± 201.5	29291.4 ± 708.8	126551.0 ± 3112.9	79580.1 ± 282.0
TNF- alpha	28.5 ± 0.5	26.6 ± 3.1	29.4 ± 0.3	24.2 ± 0.3	23.7 ± 0.0	17.3 ± 1.3	25.7 ± 2.3	20.4 ± 0.0
TGF- bata2	277.7 ± 0.0	278.3 ± 26.5	314.1 ± 3.0	283.1 ± 3.0	371.1 ± 3.8	376.9 ± 0.0	233.7 ± 0.0	279.9 ± 6.1
TGF- beta1	2836.1 ± 5.0	2739.7 ± 40.4	2625.2 ± 0.0	2750.4 ± 15.2	2290.0 ± 35.9	3467.0 ± 32.3	2445.4 ± 51.0	3134.2 ± 35.0
TGF- beta3	54.4 ± 6.4	49.9 ± 0.0	40.7 ± 0.0	40.7 ± 0.0	36.2 ± 6.5	40.7 ± 0.0	54.4 ± 6.4	40.7 ± 0.0

〈표 III-7〉 TMA 노출에 의한 시간대 별 Cytokine 및 Chemokine 변화(Smallair™)

SmallAir™	24 시간 노출				48 시간 노출			
	NC	TMA -low	TMA -mid	TMA -high	NC	TMA -low	TMA -mid	TMA -high
CCL2E /MCP-1	19984.1 ± 178.3	18422.4 ± 1344.5	15153.8 ± 1415.5	18536.0 ± 532.5	12207.7 ± 256.5	12839.6 ± 126.7	17669.7 ± 2276.0	1661.6 ± 185.9
IL-1bet a /IL-1F2	7.2 ± 2.1	3.9 ± 2.5	8.6 ± 4.1	5.7 ± 0.0	6.9 ± 6.6	10.8 ± 2.9	8.7 ± 0.0	0.0 ± 0.0
IL-13	436.6 ± 0.0	496.1 ± 49.7	594.5 ± 155.1	435.5 ± 69.7	384.9 ± 73.2	436.6 ± 0.0	484.0 ± 66.9	261.3 ± 0.0
IL-17 /IL-17A	12.8 ± 3.6	17.3 ± 0.9	15.4 ± 3.6	19.2 ± 1.8	17.9 ± 3.6	17.9 ± 3.6	20.4 ± 3.6	15.4 ± 0.0
IL-4	105.9 ± 11.9	114.3 ± 0.0	94.4 ± 12.6	104.7 ± 2.0	99.0 ± 2.1	99.0 ± 2.1	123.4 ± 12.8	82.2 ± 0.0
IL-6	1890.2 ± 21.7	1959.7 ± 16.8	1373.3 ± 22.5	1080.0 ± 84.9	565.4 ± 17.7	1978.6 ± 21.9	2343.5 ± 2.8	74.9 ± 0.0
IL-8 /CXCL8	10511.0 ± 94.8	10841.7 ± 183.9	10359.5 ± 626.7	10538.8 ± 608.7	9822.5 ± 46.7	9637.2 ± 504.4	10092.5 ± 139.5	9888.4 ± 0.0
MMP-1	4161.1 ± 95.9	4277.8 ± 123.7	3072.1 ± 23.7	4452.0 ± 450.3	2974.3 ± 86.1	4477.8 ± 2.0	5144.1 ± 138.2	1289.6 ± 0.0
MMP-2	82698.0 ± 1699.1	59204.5 ± 2575.3	57131.2 ± 483.5	73953.4 ± 1257.3	30759.1 ± 201.5	87581.7 ± 2240.8	107311.5 ± 3860.6	21500.5 ± 0.0
TNF- alpha	28.5 ± 0.5	36.5 ± 0.8	33.3 ± 3.2	25.0 ± 1.8	23.7 ± 0.0	30.2 ± 0.8	20.4 ± 1.0	10.3 ± 0.0
TGF- bata2	277.7 ± 0.0	315.7 ± 2.3	256.8 ± 2.3	264.3 ± 0.8	371.1 ± 3.8	347.7 ± 0.8	269.2 ± 3.0	77.5 ± 0.0
TGF- beta1	2836.1 ± 5.0	2560.6 ± 81.3	2250.1 ± 10.3	3517.8 ± 9.9	2290.0 ± 35.9	2796.9 ± 0.0	3664.7 ± 143.3	364.5 ± 0.0
TGF- beta3	54.4 ± 6.4	43.0 ± 3.2	40.7 ± 0.0	49.9 ± 0.0	36.2 ± 6.5	40.7 ± 0.0	54.4 ± 6.4	13.1 ± 0.0

〈표 III-8〉 MDI, TDI 및 TMA 노출에 의한 Cytokine 및 Chemokine 변화
(Smallair™-asthma)

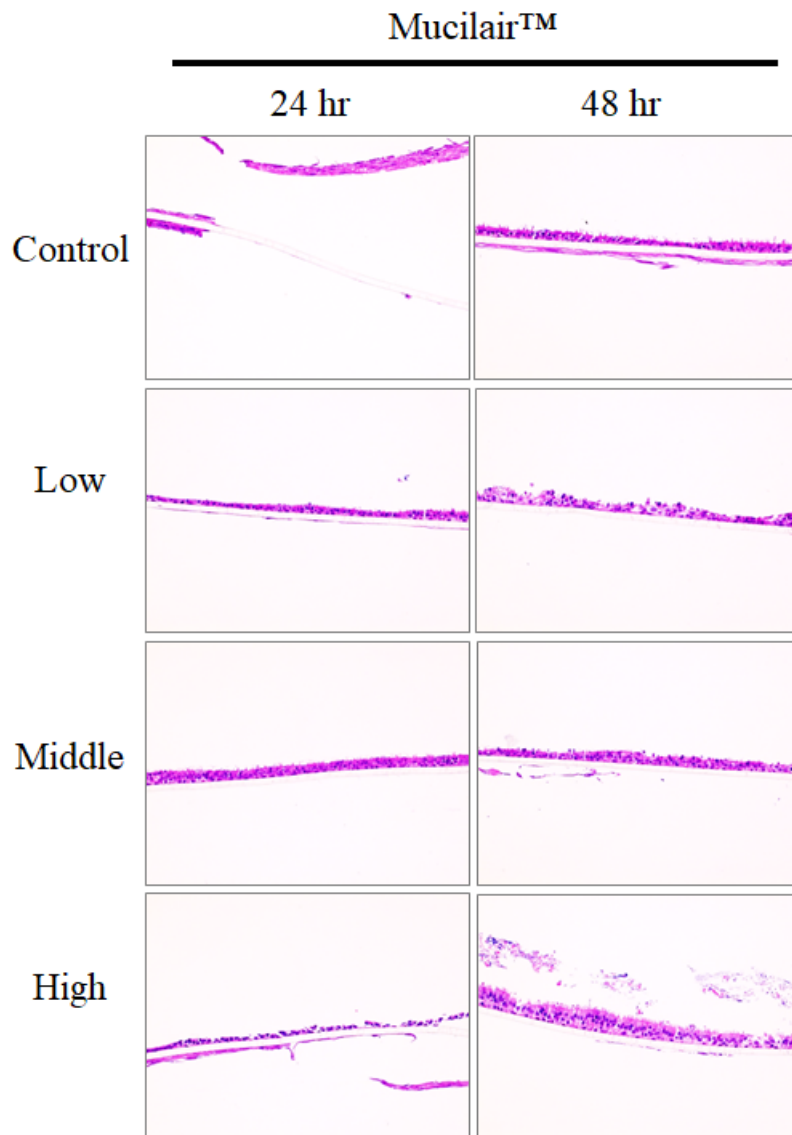
SmallAir™ -asthma	NC	MDI -low	MDI -mid	MDI -high	TDI -low	TDI -mid	TDI -high	TMA -low	TMA -hid	TMA -high
CCL2 /MCP-1	4804.7 ± 1980	2283.2 ± 129.7	3150.8 ± 101.5	3649.9 ± 38.6	6036.3 ± 217.6	4148.4 ± 535.2	1037.6 ± 25.9	6301.2 5028.9	2066.1 ± 80.1	3330.2 ± 49.4
IL-1bet a /IL-1F2	13.3 ± 2.5	12.5 ± 1.1	13.7 ± 1.6	12.1 ± 0.6	10.8 ± 1.2	7.1 ± 1.1	5.5 ± 0.0	9.8 2.1	12.1 ± 0.5	12.3 ± 2.5
IL-13	647.1 ± 28.4	646.8 ± 46.3	672.1 ± 19.0	657.2 ± 19.9	647.0 ± 32.8	606.7 ± 0.0	478.5 ± 0.0	616.6 39.3	637.1 ± 20.3	632.1 ± 19.4
IL-17 /IL-17A	20.0 ± 2.0	21.1 ± 1.3	21.7 ± 1.5	21.7 ± 1.5	20.4 ± 2.2	15.8 ± 1.3	9.8 ± 0.0	19.1 1.5	20.4 ± 0.0	20.4 ± 2.2
IL-4	122.2 ± 4.6	118.4 ± 5.8	122.9 ± 2.5	122.9 ± 2.5	121.7 ± 9.0	108.1 ± 2.4	56.7 ± 4.5	113.9 2.7	116.2 ± 5.3	116.2 ± 3.7
IL-6	183.4 ± 123.6	212.3 ± 37.4	324.8 ± 44.3	324.4 ± 7.7	160.7 ± 52.1	131.8 ± 13.1	112.2 ± 53.9	194.1 109.8	261.1 ± 10.3	366.2 ± 7.5
IL-8 /CXCL8	8433.3 ± 1003.7	9664.6 ± 156.7	9572.7 ± 145.4	9529.4 ± 26.8	8457.5 ± 916.8	5992.3 ± 943.6	2470.2 ± 166.6	8300.8 538.6	9380.6 ± 25.2	9290.8 ± 204.7
MMP-1	3211.9 ± 406.7	3000.5 ± 971.8	3671.3 ± 76.5	3535.4 ± 148.4	2623.4 ± 108.2	2202.4 ± 823.7	342.9 ± 41.7	1977.4 1335.6	2854.3 ± 180.7	2586.6 ± 74.7
MMP-2	17942.0 ± 442.9	18052.9 ± 241.2	19127.8 ± 424.2	18565.8 ± 514.4	20424.9 ± 998.3	18191.0 ± 374.9	10530.3 ± 633.6	17146.8 4703.3	15170.1 ± 164.8	16283.0 ± 570.4
TNF- alpha	10.2 ± 0.7	10.9 ± 0.8	11.3 ± 0.0	11.2 ± 0.3	10.0 ± 0.7	8.5 ± 0.0	4.7 ± 0.3	9.2 1.0	10.8 ± 0.5	10.5 ± 0.3
TGF- bata2	107.2 ± 32.9	150.3 ± 23.0	141.6 ± 8.2	129.1 ± 15.9	99.3 ± 37.7	98.6 ± 10.4	60.4 ± 7.9	83.0 23.7	145.7 ± 7.7	139.7 ± 17.1
TGF- beta1	481.3 ± 215.1	624.9 ± 50.6	644.9 ± 95.6	655.0 ± 92.0	508.8 ± 152.7	388.9 ± 55.1	217.9 ± 107.4	382.9 134.5	558.4 ± 22.7	653.8 ± 107.4
TGF- beta3	17.9 ± 14.4	23.8 ± 7.0	26.1 ± 12.3	19.2 ± 5.9	18.0 ± 3.8	9.6 ± 7.2	23.8 ± 4.5	21.4 10.4	19.1 ± 12.3	18.0 ± 7.7

5. 시험 물질에 의한 호흡기계의 조직병리학적 변화

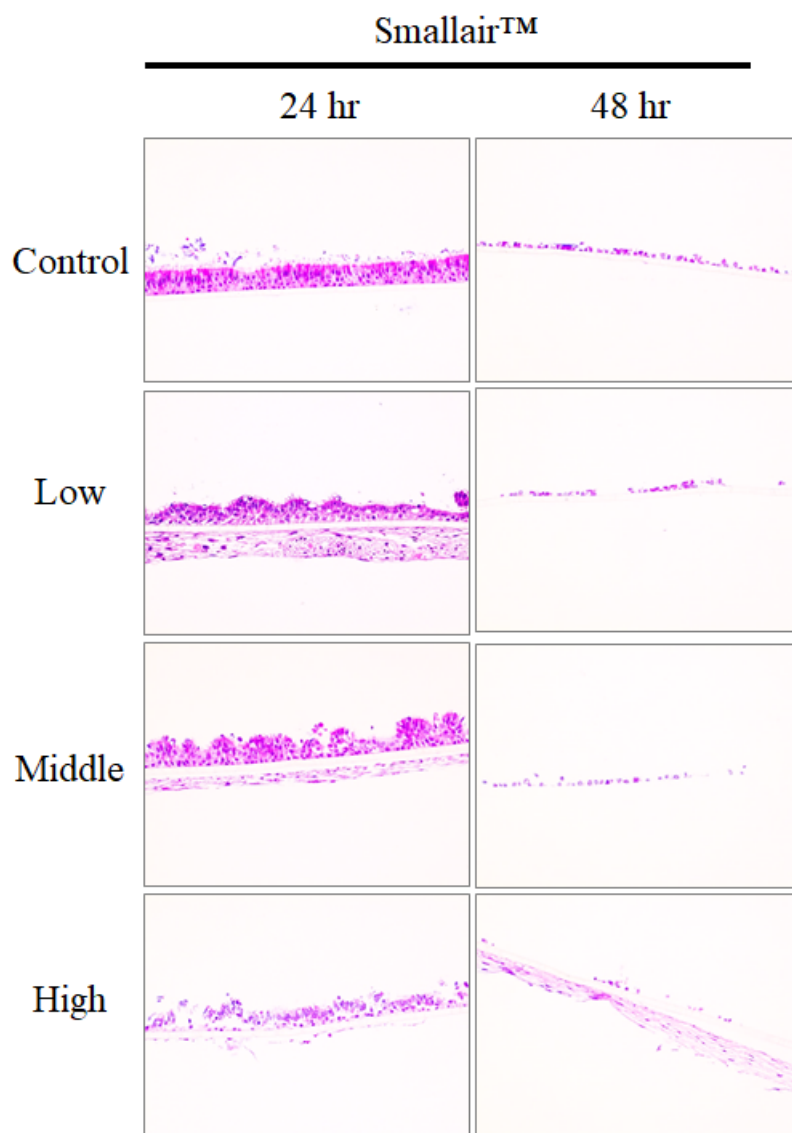
각 시험물질의 농도 및 시간별 노출에 따른 상부호흡기(Mucilair™) 및 하부호흡기(Smallair™ / Smallair™-asthma) 3D-cell model의 단면을 염색 후 광학현미경을 통해 관찰하여 형태학적 변화를 확인하였다.

1) 일반 HE 염색을 통한 형태학적 변화 확인

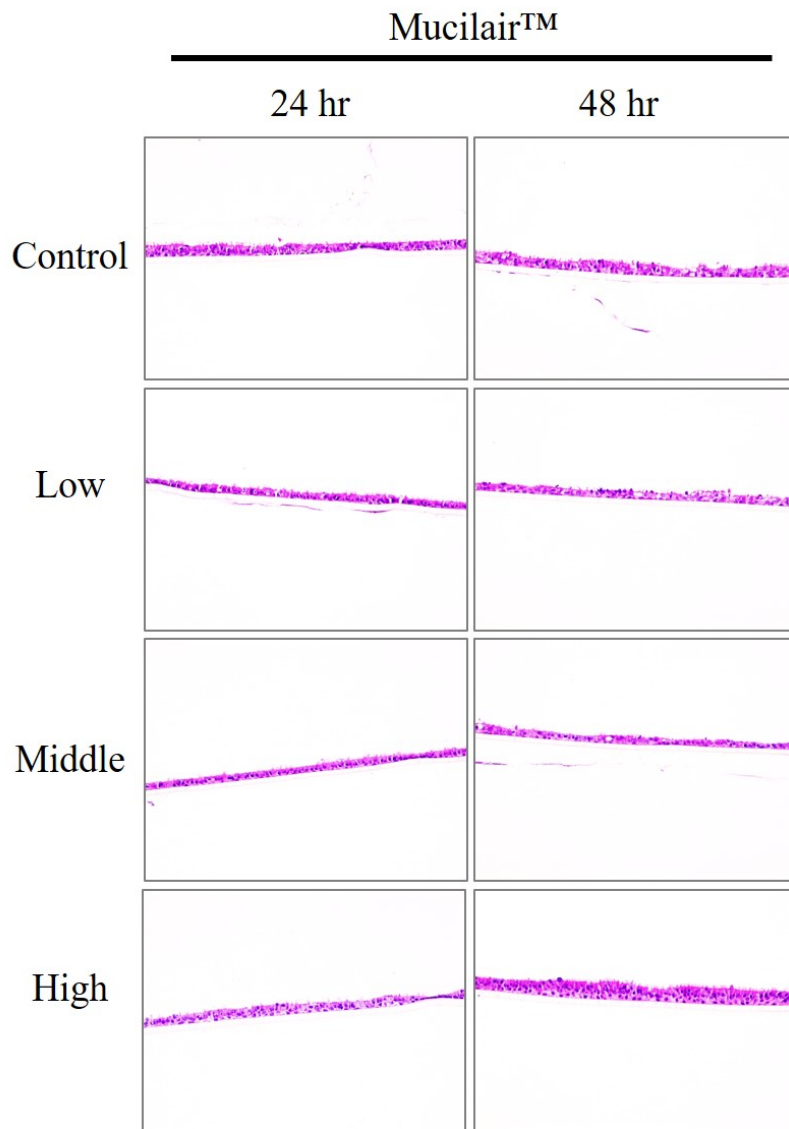
Hematoxylin & eosin 염색을 수행 후 검경을 통해 확인된 해당 변화를 시험 물질에 따라 그림으로 나타내었다. Mucilair™의 경우 각 단면은 세포 손상 정도에 따라 상피 세포의 높이 변화, 상피 탈락, 비정형 변성 등의 변화를 보였다. 또한 Smallair™의 경우 시험 물질 투여 24시간 후 상피세포의 hyperplasia 및 cyst 형성이 관찰되었으며, 48시간 후 세포 간 연결 손상으로 인해 전체 세포가 배양판에서 탈락하는 모습을 보였다. Smallair™-asthma에서 천식 환자의 세포로 구성된 대조군에서 호흡기계 상피의 변성을 확인할 수 있었으며, 시험 물질의 투여에 의해 변성의 정도가 증가하였으며 손상으로 인한 상피 탈락 구간이 확인되었다.



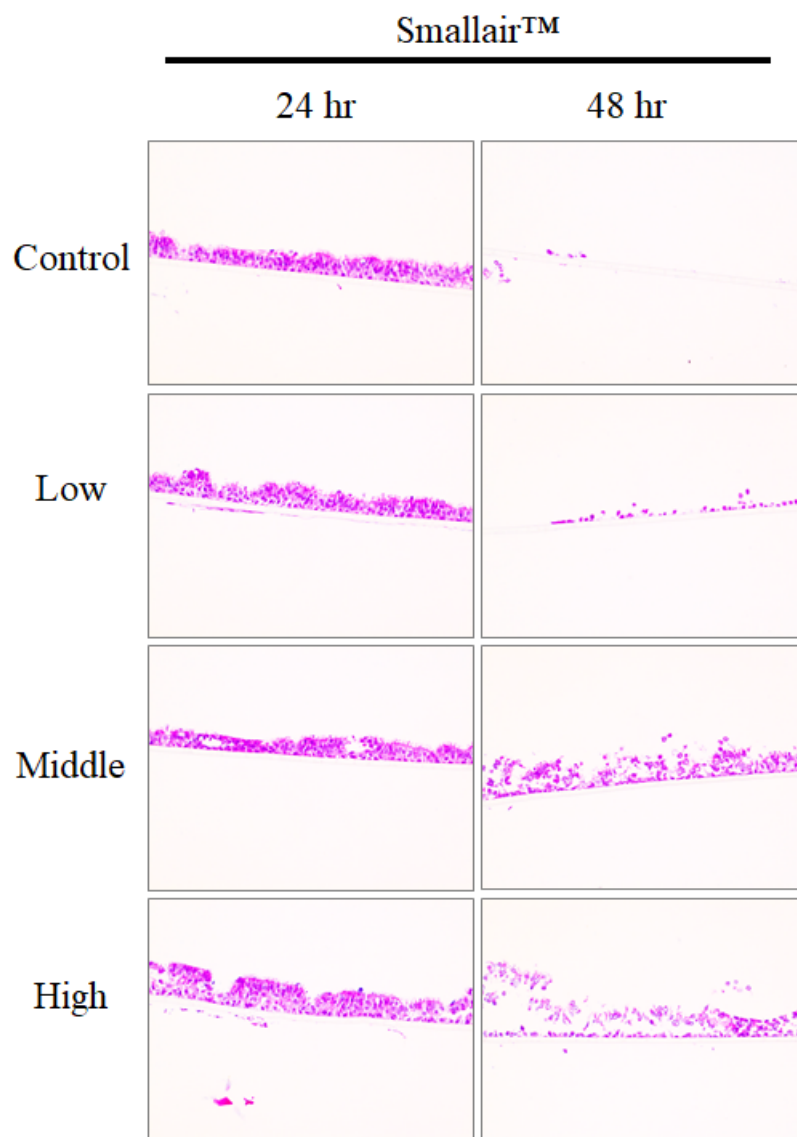
[그림 III-3] MDI에 의한 상부 호흡기계 3D-cell model의
시간대 별 형태학적 변화(x200)



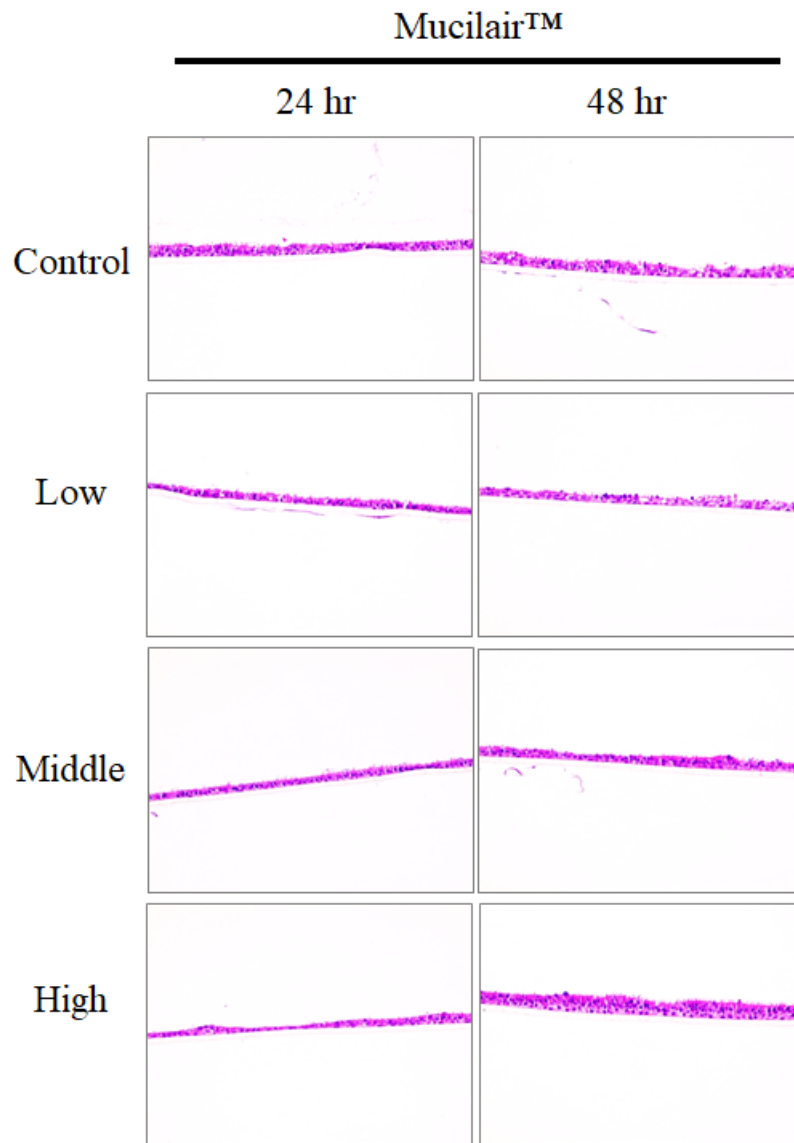
[그림 III-4] MDI에 의한 하부 호흡기계 3D-cell model의 시간대 별 형태학적 변화(x200)



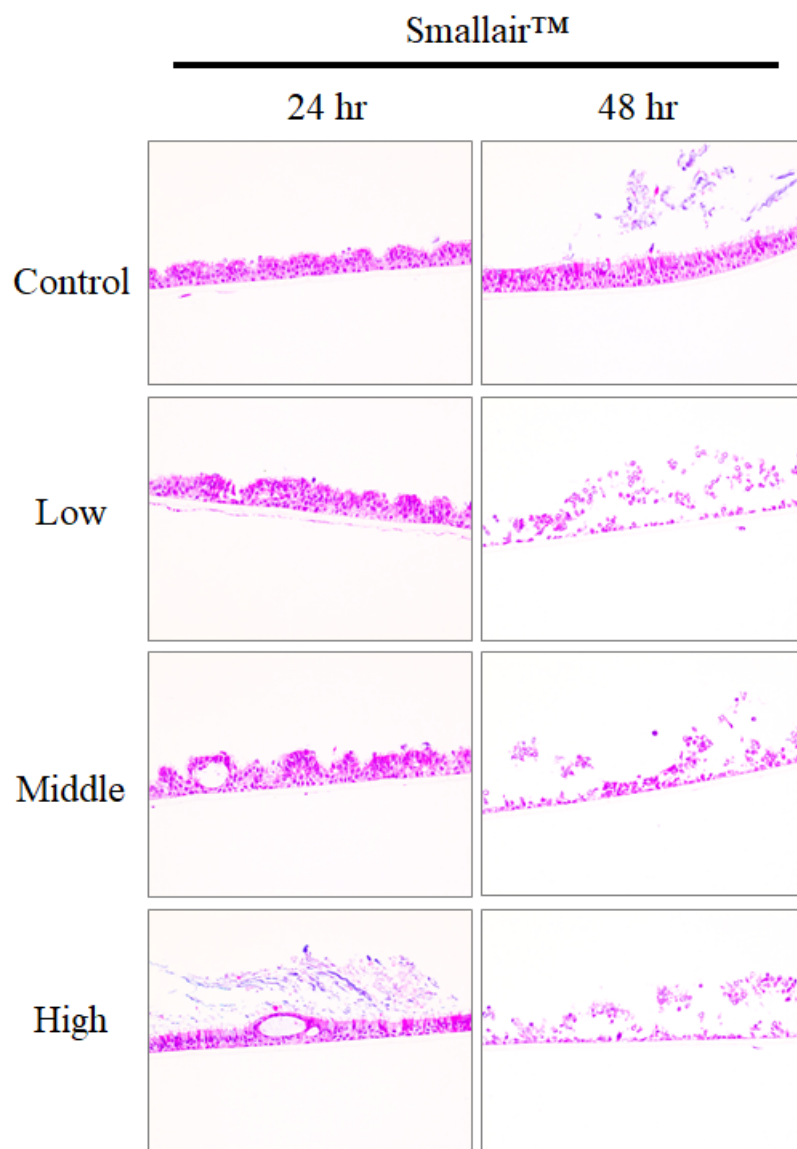
[그림 III-5] TDI에 의한 상부 호흡기계 3D-cell model의 시간대 별 형태학적 변화(x200)



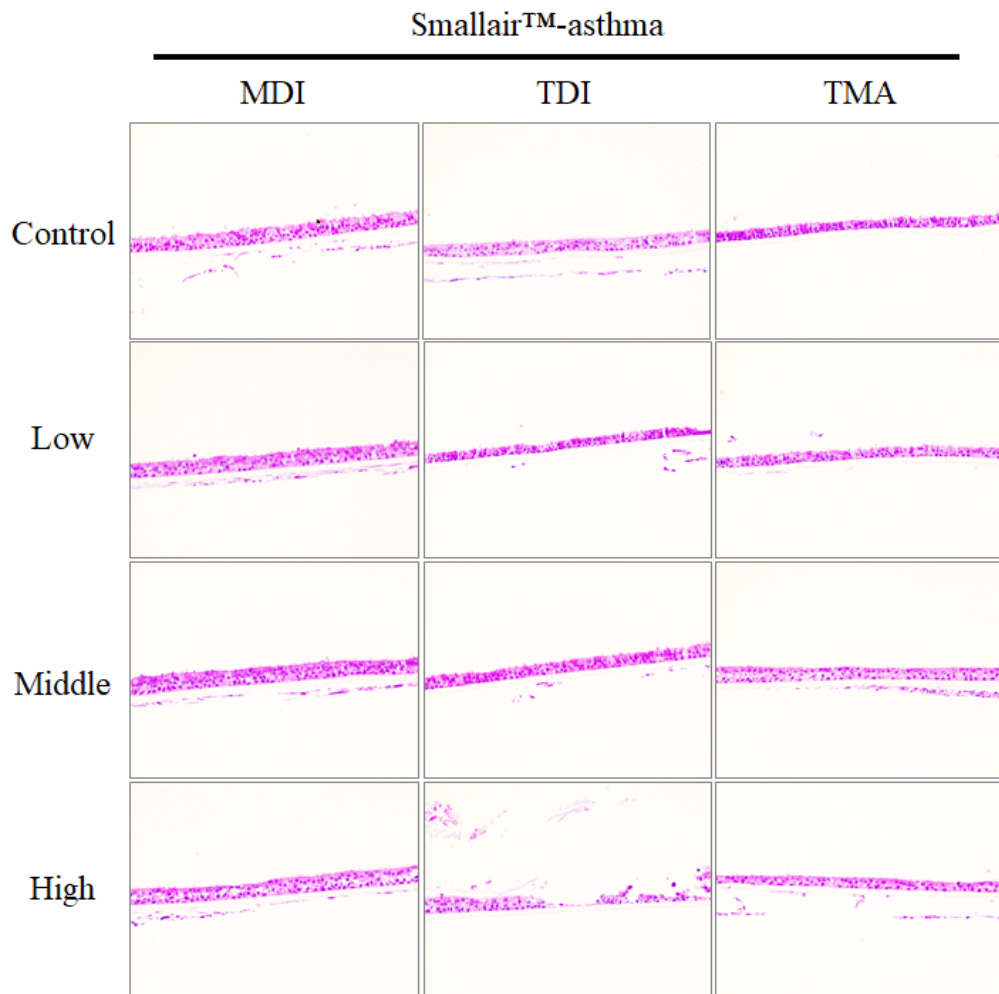
[그림 III-6] TDI에 의한 하부 호흡기계 3D-cell model의 시간대 별 형태학적 변화(x200)



[그림 III-7] TMA에 의한 상부 호흡기계 3D-cell model의 시간대 별 형태학적 변화(x200)



[그림 III-8] TMA에 의한 하부 호흡기계 3D-cell model의 시간대 별 형태학적 변화(x200)

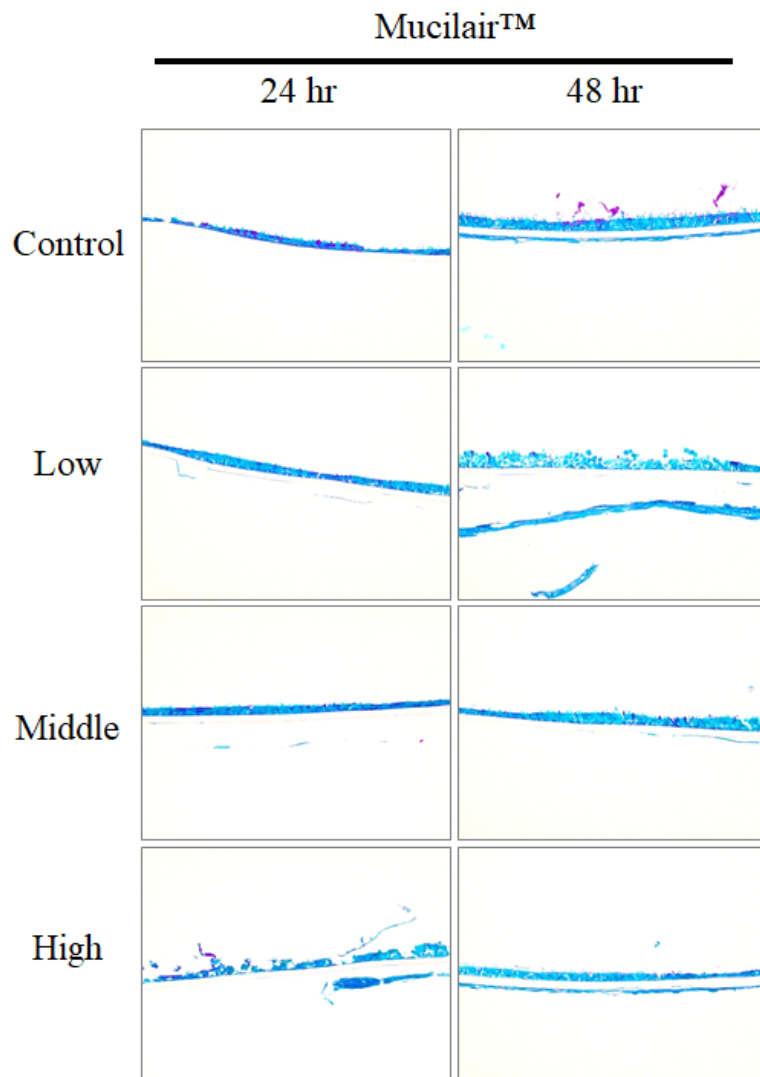


[그림 III-9] MDI, TDI 및 TMA에 의한 천식 이환 하부 호흡기계 3D-cell model의 24시간 후 형태학적 변화(x200)

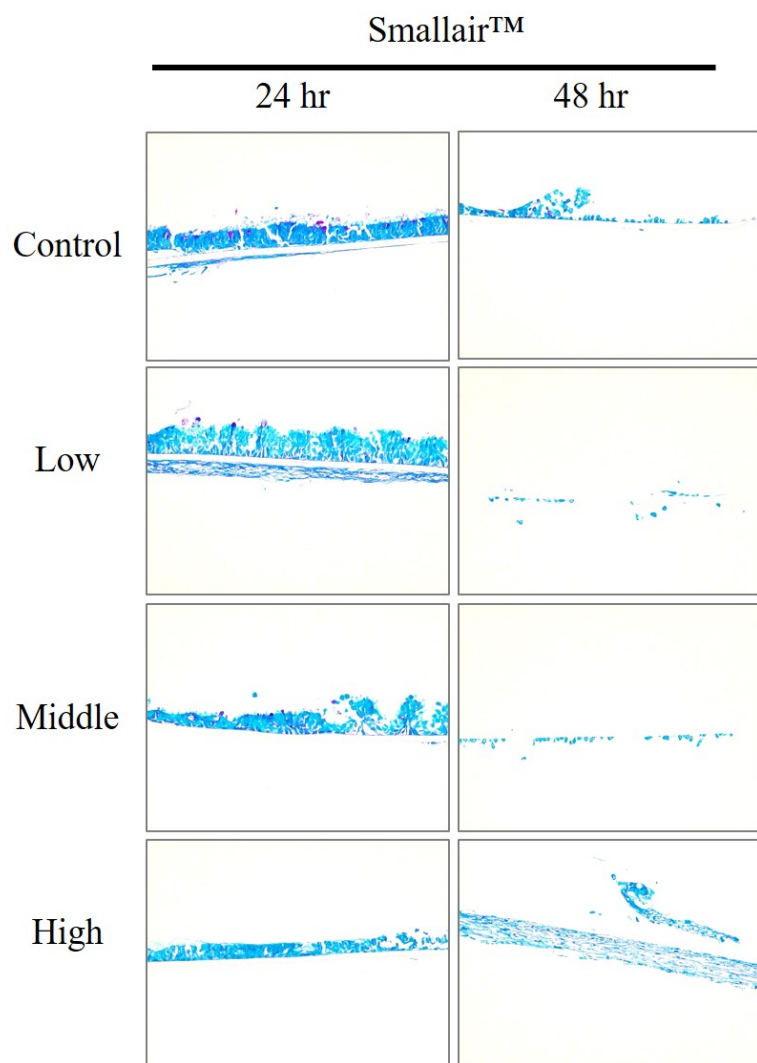
2) 특수 염색을 통한 점액 분비 확인

점액 분비 세포에서 분비된 mucin을 확인하기 위해 PAS 염색을 수행 후 검경을 통해 확인된 해당 변화를 시험 물질에 따라 그림으로 나타내었다. 각 단면에서 세포 자극 정도에 goblet cell 및 club cell에서 분비된 mucin은 광학현미경 상에서 자주색으로 확인되었다.

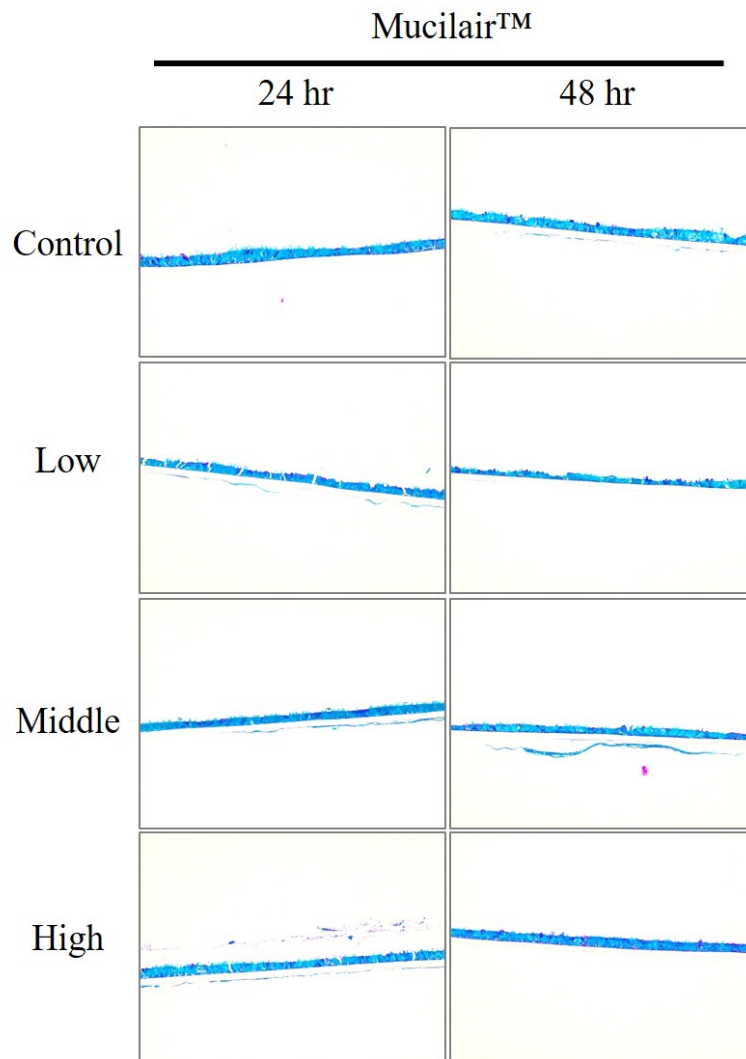
각 시험물질 투여 후 mucin 분비가 증가하였으나 48시간 투여군 중 손상이 심해 탈락 세포가 많은 well에서는 분비가 상대적으로 적어 보였으며, 천식 이환 모델에서는 대조군에서 다량의 점액 분비가 확인되었으며, MDI를 제외한 나머지 물질에서 시험물질의 투여에 의한 mucin 분비가 대조군과 큰 차이를 보이지 않았다.



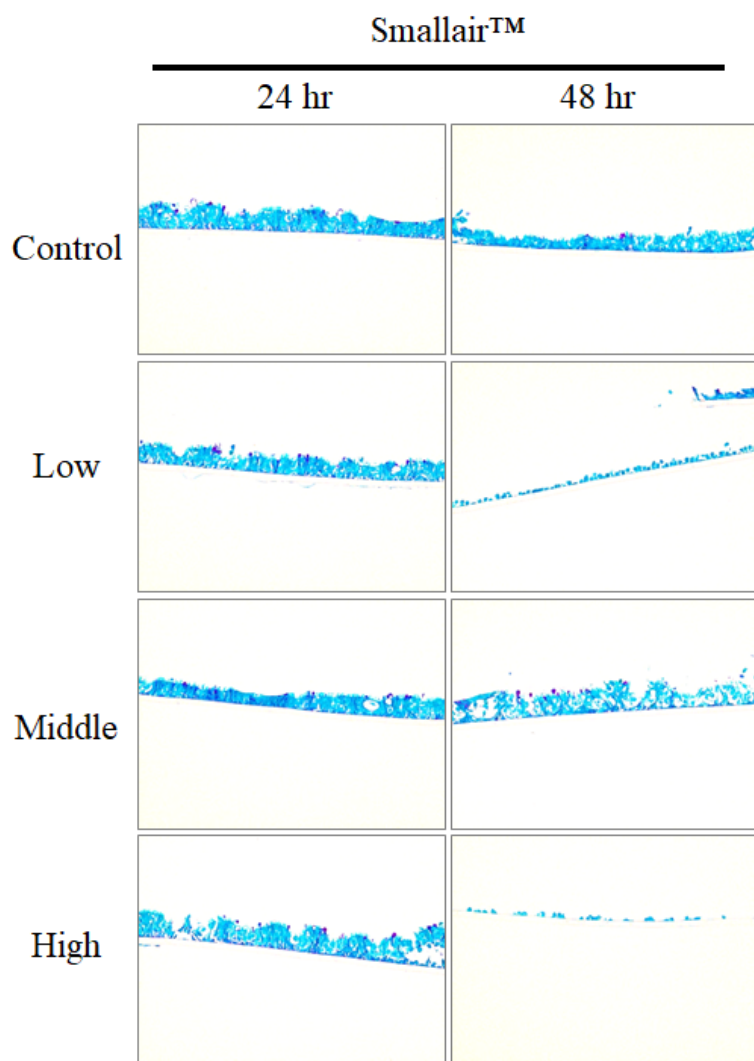
[그림 III-10 MDI에 의한 상부 호흡기계 3D-cell model의 점액 생성 변화 (x200)]



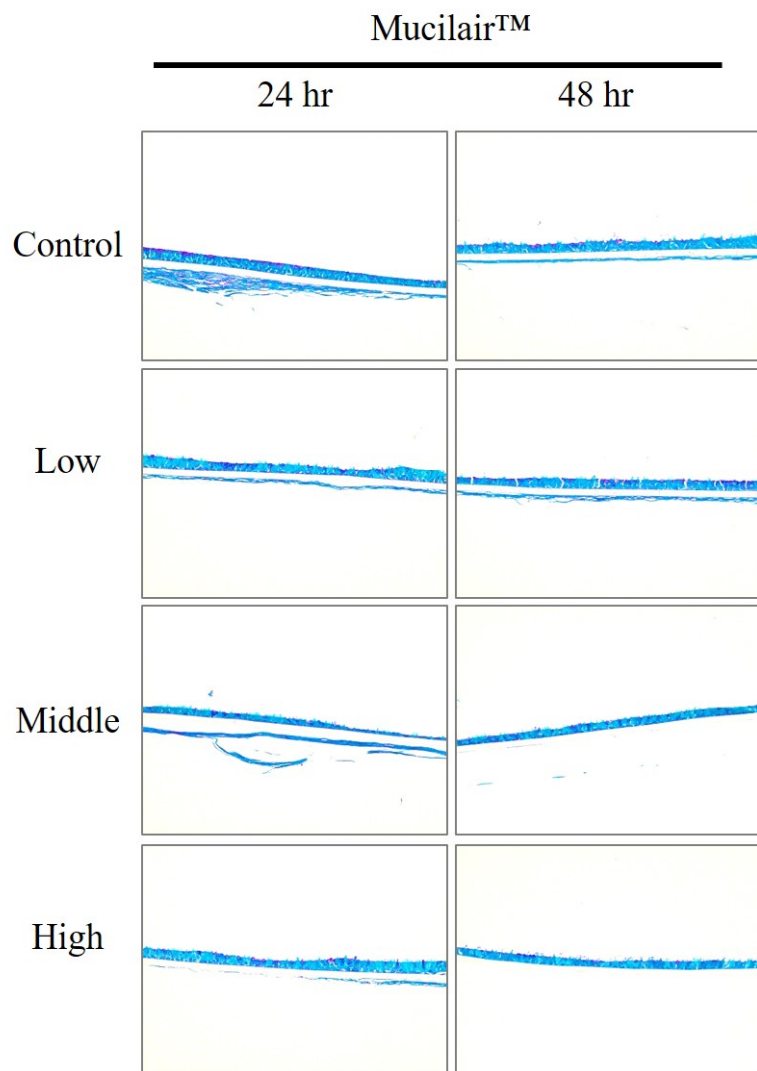
[그림 Ⅲ-11] MDI에 의한 하부 호흡기계 3D-cell model의 점액 생성 변화 (x200)



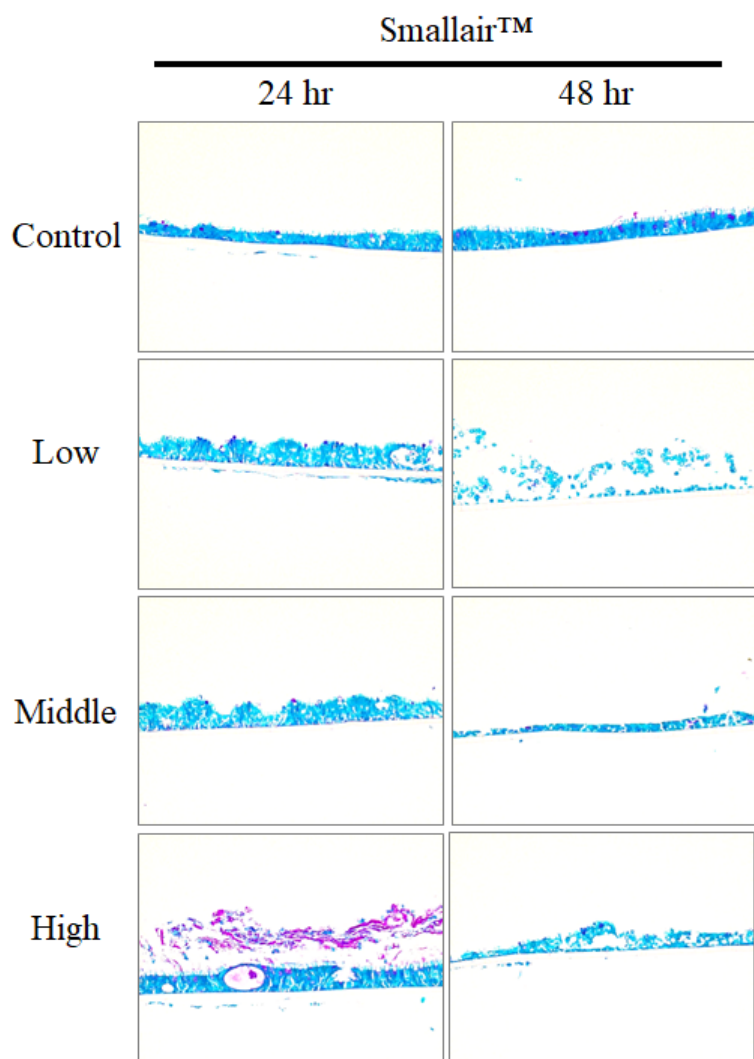
[그림 III-12] TDI에 의한 상부 호흡기계 3D-cell model의 점액 생성 변화 (x200)



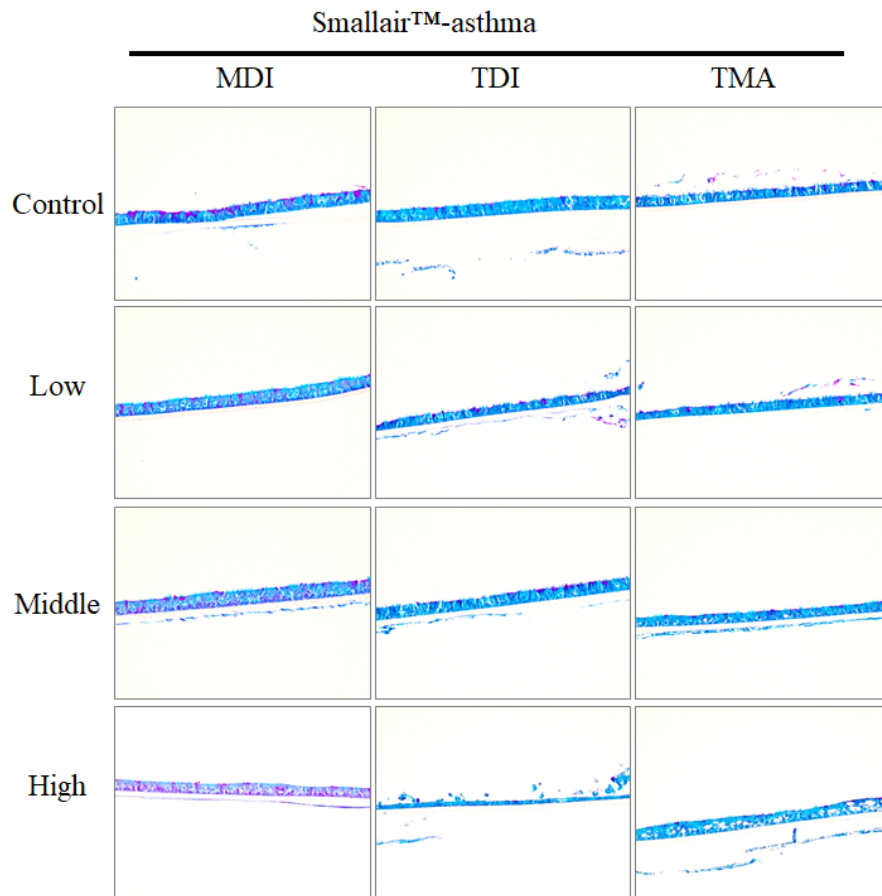
[그림 Ⅲ-13] TDI에 의한 하부 호흡기계 3D-cell model의 점액 생성 변화 (x200)



[그림 III-14] TMA에 의한 상부 호흡기계 3D-cell model의 점액 생성 변화 (x200)



[그림 Ⅲ-15] TMA에 의한 하부 호흡기계 3D-cell model의 점액 생성 변화 (x200)



[그림 III-16] MDI, TDI 및 TMA에 의한 천식 이환 하부 호흡기계 3D-cell model의 24시간 후 점액 생성 변화(x200)

IV. 고찰

.....

IV. 고찰

1. AOP의 이용 및 전망

1) AOP의 연구 방향

AOP는 2010년 OECD 주도로 개발되기 시작한 이래, 화학물질의 안전평가의 효율성과 정확성을 증가시키기 위해 지속적으로 다양한 개념들이 추가적으로 개발되고 있다. 또한 화학물질 뿐만 아니라 최근 나노물질 및 방사선 등의 요인에 대해서도 연구가 지속되고 있으며(Chauhan et al., 2019; Jeong et al., 2018), 데이터마이닝과 딥러닝 등의 기계적 학습 방법을 이용한 새로운 AOP 생산 방법이 제안되기도 한다(Rugard et al., 2020). 또한 AOP는 정성적 또는 정량적 AOP로 구별되기도 하는데, 이 중 정량적 AOP(quantitative AOP, qAOPs)는 화학물질의 정량적 위험 평가를 위한 도구로 유용하게 사용될 수 있다(Coady et al., 2019). qAOP는 일종의 예측적 계산 모델로 이용될 수 있으며, AOP를 구성하는 KE 사이에 변화량과 플러스 또는 마이너스 요인을 통해 AO가 도출될 수 있는 가능성을 판단할 수 있기 때문에 qAOP의 모델 개발을 위한 많은 연구가 이뤄지고 있다(Wittwehr et al., 2017). OECD에서는 AOP 개발을 위한 기본 지침을 발표하며 KER의 정량적 이해에 대한 중요성을 강조하였으며(OECD, 2018), 그 이전에 이미 통합 시험평가 접근법(IATA)의 개발을 위해 qAOP가 KE를 특정하거나 AO의 평가 방법 개발 또는 개선에 유용함을 명시한 바 있다(OECD, 2016). 따라서 하나의 AOP를 구성하는 각 KE의 종류 및 관계적 가중치의 확보는 AOP의 과학적 신뢰성을 확보하는데 매우 중요한 일이 될 수 있다.

2) 직업성 알러지성 호흡기 질환 관련 AOP

지난 연구 과제를 통해 ODCD의 AOP wiki 내 개발 중인 유일한 천식 관련 AOP(AOP 39)를 분석하였고, 이를 통해 동일 MIE를 갖는 AOP 1건 및 새로운 기전의 AOP 1건을 제안하였다. AOP 39는 저분자중량 유기 화학물질과 관련된 기전임을 명시하고 있으며, 저분자중량 유기 화학 물질에 대한 호흡기 또는 피부 노출 후 공유적 단백질 결합에서 시작되어, 이 단백질 결합이 상피와 다른 세포에 의해 유도된 산화 스트레스, 사이토카인 및 스트레스 반응 경로 관련 세포 위험 신호를 활성화해 수지상세포를 성숙시키고, 림프절로 이동하게 한다고 설명한다(Sullivan et al., 2017). 또한 이로 인해 생성된 heptene에 의해 수지상 세포가 활성화 되며, Th2에 치우친 수지상세포는 감각 단계를 활성화하고 화학물질에 의한 호흡기 알레르기를 유발하여 최종적으로 감작을 유발하는 것으로 정의하였다(AOPwiki, 2020). 지난 연구 과제를 통해 제안된 AOP 및 KE의 내용 중의 일부를 실험적으로 증빙하기 위해 이번 과제에서 사람의 호흡기 세포를 이용한 3D-cultured model을 이용하여 화학물질의 노출로 인해 생체 내에서 ROS의 변동에서 시작되는 다양한 염증 관련 cytokine/chemokine의 변화를 확인하려고 하였다.

2. 호흡기계 연구에서의 대체 시험법 적용

1) 사람 장기 대체 연구의 개발

동물대체시험법의 개발은 동물 윤리 및 복지의 측면과 다량의 시료 처리 속도 및 정밀한 분석으로 인해 주목받고 있다. 미국 및 유럽에서는 각각 ICCVAM(Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)과 EU-ToxRisk를 통해 동물을 이용하지 않는 다양한 시험기술 방법의 개발과 활용에 주목하고 있다. 대표적으로 2D 및 3D로 구성된 인체 장기 구성 세포, Tissue slide model, 빠른 스크리닝을 위한

automated quantitative High content imaging, PBPK modeling과 접목한 Organ(body)-on-a-chip, Omics, Read-across 등이 잘 알려져 있다(Escher et al., 2019; Mone et al., 2020; Prantil-Baun et al., 2018). 또한 이를 활용하여 반복장기독성(Repeat dose organ toxicity)과 발생독성(reproductive toxicity)에 대해 프로그램을 이용한 독성예측 분야가 활발하게 연구되고 있다. 현재 부분적으로 간, 폐, 신경계, 생식기계 등의 데이터 수집을 위한 동물대체기술이 개발되었으며 각 데이터는 실제 환자의 정보(유전체 정보 등) 및 추가적인 biokinetics 정보와 결합하여 최종적으로 화학물질의 반복적 장기 독성을 예측하려 하고 있다(Punt et al., 2020).

미국의 EPA는 2016년부터 21세기를 위한 화학물질 안전법에 의해 독성물질 관리법(TSCA)이 업데이트 되고 있다. EPA는 이를 통해 척추 동물 실험을 줄이거나 개선하거나 대체하기 위한 대체 테스트 방법 및 전략의 개발 및 구현을 촉진하고 동등하거나 더 나은 과학적 품질 및 부상 위험 평가 관련성에 대한 정보를 제공하기 위한 전략 계획을 개발하도록 요구하고 있다. 이를 위한 전략적 개념으로 NAMs를 이용하고 있으며, 기존의 화학물질과 신규 개발되는 화학물질의 위해도 평가를 포함한다. 또한 NAM에는 위험도(인체 건강 및 환경), 노출 및 환경적 결과를 평가하는 방법과 의사 결정을 위해 NAM을 통합하는 다양한 접근 방식을 포함하는데, 이를 위한 도구로 AOP, 테스트 및 평가에 대한 통합 접근 방식(IATA), 정의된 접근 방식(DA) 등이 있다.(Ankley et al. 2010). 복잡한 독성학적 반응을 예측하기 위해 NAM을 통합하는 것 외에도 계층적 접근 방식에서 NAM을 결합하면 많은 수의 화학 물질을 보다 효율적으로 테스트할 수 있으며, 척추동물이 아닌 대체 종, 더 복잡한 시험관 내 배양 시스템 및/또는 *In silico* NAM은 생물학적 표적 또는 작용 방식을 추가로 개선하기 위해 다음 계층으로 통합되어 궁극적으로 화학 물질을 추정되는 AOP와 연결할 수 있다(Parish et al., 2020). 또한 OECD는 IATA(Integrated Approaches to Testing and Assessment) 라는 용어를 이용하여 각 의사 단계 별 불확실성 수준을 판단하고 특정 규제 측면에서

이용하기 위해 구조화된 접근 방식을 취하는 프레임워크를 이용하며, IATA는 AOP와 연결하여 구축될 수 있음을 명시하고 있다(Ankley et al. 2010). 이러한 방식을 통해 이미 피부과민물질 또는 내분비 생리활성 화합물의 스크리닝을 위한 모델이 개발되었다.(Browne et al., 2015)

2) 호흡기 연구를 위한 대체 모델

호흡기는 특정 영역에 위치한 수많은 세포 유형으로 구성된 복잡한 기관으로, 이러한 복잡성으로 인해 단일 체외 폐 모델을 만드는 것이 어렵고 현재 기술적으로 완성된 모델은 없다. 초반의 기술 개발을 PTBE, BEAS-2B, A549, PSAE, Met-5A 및 Calu-3과 같은 불멸화/변환된 세포주를 사용한 연구들이 진행되었으나, 단순화되고 불멸화된 모델은 유전자 발현 및 생물학적 기능이 실제 생체 내 표현형과 다를 수 있어 기도의 특정 영역에 대한 기관형 다중 세포 유형 모델이 개발되고 있다. 현재 상용화된 시험관내 상기도 모델은 MucilAir™, SmallAir™(Epithelix S'arl) 및 EpiAirway™(MatTek Corporation)가 있다. 이들은 섬모 세포, 점액 분비 잔 세포 및 기저 세포로 구성되며(Balharri et al., 2008; Huang et al., 2013) 다양한 문헌을 통해 폐의 관련 영역에서 생리학적 조건을 반영하는 것으로 입증되었다. 이 모델들은 세포간 상호작용의 연구를 가능하게 하고(Clippinger et al., 2018), 호흡기 독성의 향후 시험관내 평가에서 충분한 역할을 할 것으로 예상된다. 이미 MucilAir™는 호흡기 질환에 대한 흡입 약물의 생체 내 기도 독성을 예측할 수 있을 것으로 문헌 보고가 되고 있다(Baloh Sivars et al., 2018). 또한 건강한 기증자 외에 낭포성 섬유증, 천식, COPD 등의 기도 질환이 있는 기증자로부터 제공받아 모델을 구성하기도 하며(Beubler et al., 2016; Chortarea et al., 2017), 이는 질병 상태에 대한 치료법을 개발하거나 특정 화합물질에 취약함을 확인하기 위한 위험 평가에 유용할 수 있다(Welch et al., 2021). 이번 연구를 호흡기계 3D-model의 각 화학물질에 의한 세포 손상 여부를 확인한 결과, 시험 물질에 따라 높은 농도 및 손상 시간의 지속으

로 인한 경우를 제외하고 저/중농도에서 LDH 누출에 따른 손상 결과를 확인하였으며, 특히 천식환자의 세포를 이용한 하부호흡기계 모델에서 농도에 따른 손상 여부를 명확하게 확인하였다.

3. 알러지성 호흡기 질환의 주요 이슈

기 수행한 과제 중(2017) 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).

알러지성 천식에 중요한 cytokine으로 IL-4와 IL-13가 잘 알려져 있다. 이들은 Th2-cell 및 비만세포에서 주로 분비되며 IL-4의 경우 미성숙 T-cell을 Th2-cell로 분화시키며 B-cell의 IgE 생산에 중요한 역할을 수행한다. 또한 IFN-gamma 및 IL-12를 억제하여 Th1-cell에 의한 반응을 감소시킨다. IL-13은 Th2-cell로 인한 염증 반응에 중요한 역할을 하는 cytokine으로 IL-4와 같은 수용체를 공유하며 비슷한 역할을 수행한다. 이 두 cytokine은 STAT-6 pathway를 통해 호산구, 대식세포 및 수지상세포의 활성화 및 섬유아세포의 활성화를 유도하여 기도 염증 및 기도 내 환경의 재구성을 유발한다. 또한, B-cell을 활성화시켜 IgE 분비를 증가시키고 기도 내 상피 및 점액 분비세포의 활성화 및 기도 과민반응을 유발하는데 중요한 역할을 수행한다

(Kim and Lee, 2019). 이번 연구에서 시험물질 노출 및 정상인 또는 천식환자 유래 세포에서의 cytokine 또는 chemokine의 변화를 탐색하려 하였고, 면역학적으로 통일성 있는 변화는 확인되지 않았다.

4. 호흡기계 질환과 산화적 손상

산화적 손상에 대응하는 세포 신호 조절에 대한 과산화물과 H₂O₂의 이중적 역할에 대해 흥미로운 연구가 있다. 이 연구에 따르면 초과산화물(superoxide)을 발암성(oncogenic) ROS로 여기고, H₂O₂를 '발암억제성(oncosuppressive)' ROS로 간주하여, 초과산화지질이 우세한 경우 세포자멸을 억제하고 세포의 생존을 촉진하며, H₂O₂가 유리한 경우 세포자멸과 세포사멸의 유도에 적합도록 세포 내 환경이 조성된다는 연구이다. 이 가설에 대한 근거로서, 우선 거의 모든 유형의 암세포는 미토콘드리아 기능 장애와 NADPH 의존성 산화효소 복합체(NOX)의 상향 조절로 인해 과산화지질과 영구 산화스트레스의 과잉생성을 특징으로 하며, H₂O₂는 비정상적인 농도에서 세포자멸을 유도하고, 과산화지질 디스무타아제(SOD) 및 SOD 유도체의 과발현은 체외 및 체내 암세포의 성장과 증식을 억제하여 H₂O₂의 종양 억제 역할에 대한 연구 결과가 존재한다. 즉 초과산화지질과 H₂O₂는 세포에 대해서로 다른 신호 경로를 활성화하여 생존 또는 세포자멸이라는 반대 결과를 초래하는 것으로 보인다(Pervaiz et al., 2007; Zhelev et al., 2017). 또한 이번 연구에서 시험물질로 사용한 디이소시아네이트류의 흡입에 관한 여러 연구들에서 반응성 산소종 및 질소종을 통해 산화적 스트레스를 유발하여 최종적으로 조직 손상을 유발하는 것으로 잘 알려져 있다. 이에 따르면 산화적 스트레스로 인해 생성된 생산물에 대한 해독 기전이 억제될 경우 염증 및 기관지 수축 기전의 활성화를 통해 천식의 발병으로 연결된다고 알려져 있다(Lantz et al., 2001; Kim et al., 2010). 이번 연구를 통해 각 시험물질에 의한 ROS/RNS 변화를 확인한 결과 정상인의 3D-cell model에서 시간대별

변화를 확인하였다. 또한 정상인의 세포로 구성된 모델보다 천식환자의 세포로 구성된 하부호흡기계 모델의 경우 TDI의 경우 대조군과 명확한 차이를 보이는 바, 이는 다양한 원인(생활 환경, 특수한 작업 환경, 날씨 등)으로 천식에 이환된 환자에서 특정 물질에 의한 산화적 손상 반응이 명확함을 나타내는 것으로 생각되며, 산화적 손상의 증장기적 지속으로 인한 각 구성 세포의 형태학적 변화 이전의 초기 손상에 대한 지표로서의 활용 가능성으로 여겨진다.

5. 동물대체모델 시험의 AOP 적용의 제한점과 가능성

시험에 이용된 3D-model의 단면을 HE 염색으로 확인한 결과, 정상인의 세포를 이용한 모델에서는 각 시험 물질 투여에 의한 직접적인 세포손상 형태 보여주었으나, 천식 환자의 세포를 이용한 모델에서는 동일 물질 투여에 의한 세포손상의 정도가 약하여 대조군과 비교하여, 형태적 변화가 크지 않았다. 천식 환자의 세포를 이용한 모델에서는 MDI의 최대 시험 농도를 낮췄고, TMA의 최대 시험 농도를 늘렸으나, 형태학적 변화가 크지 않았다. 그러나 정상인의 세포로 실험한 48시간의 결과를 확인했을 때, 시험 물질에 의한 형태학적 영향이 크게 나타나는 것으로 보아, 3D-cell model을 이용한 시험은 각 시험 물질의 농도 및 노출 시간 설정이 매우 중요할 것으로 보인다. 시험 물질에 의한 점액 분비를 특수염색을 통해 확인한 결과, 각 시험물질 투여 후 mucin 분비가 증가하였으나 천식 환자의 세포를 이용한 하부호흡기계 모델에서는 대조군에서 다량의 점액 분비가 확인되었고, TDI 및 TMA의 경우 시험물질에 의한 점액 분비가 크게 나타나지 않았다. 호흡기계 상피의 점액 분비는 자극에 의한 반응의 지표로 사용되고 있으며, 시험에 사용한 MucilairTM의 경우 상부 호흡기계를 모사해 제작했기 때문에 goblet cell이 주요 점액 생성 역할을 수행하고, SmallairTM의 경우 club cell이 동일한 역할을 수행한다. 관련되어 상세한 문헌은 찾아볼 수 없었으나, 물질에 따른 특징적인 각 세포 반응의 결과로 여겨진다. 점액 분비 세포별 역할에 대한 다른

연구에 따르면, 사람의 club cell의 경우 마우스와 다르게 기도 내 basal cell과의 연결을 통해 항생제의 대사 과정에서 추가적인 역할을 수행함으로써 숙주의 방어 기제, 생체내 이물에 대한 반응, 항프로테아제 및 유전성 폐질환 등에서 핵심적인 역할을 수행함을 강조했고(Dean et al., 2018; Zuo et al., 2018), 이러한 연구와 더불어 사람의 기도 내 상피를 구성하는 추가적인 세포(single cell derived normal human small airway basal cell)에 대한 연구도 진행되고 있다. 저자들은 해당 세포라인을 이용하여 만성폐쇄성폐질환 환자에서 확인되는 특정 유전체의 변화를 확인하였고, 이를 통해 해당 세포 모델을 이용한 만성폐쇄성폐질환의 평가 가능성을 연구하였다(Wang et al., 2019).

이번 연구과제는 지난 연구과제를 통해 제시한 직업성으로 발생할 수 있는 천식 유발물질의 AOP 내용 중 일부 KE를 실험적으로 탐색했다. 잘 알려진 MDI, TDI, TMA를 시험물질로 선정하여 3D-cell 사람 호흡기 세포 모델을 이용해 시험을 실시하였다. 결과적으로 각 시험물질에 의한 세포손상(LDH 증가) 및 산화적 손상(ROS 증가), 뮤신 분비 증가를 확인하여 화학물질에 의한 호흡기계 동물대체모델에서의 가능성을 확인할 수 있었다. 그러나 다음 단계로 제안된 생체 내 cytokine 및 chemokine의 명확한 변화는 밝혀지지 않아, 초기 손상 탐색을 위한 구성 세포 내 특정 유전체 분석, 특정 세포 또는 면역 관련 세포의 co-culture를 통한 호흡기계 모델을 이용한 실험 데이터 보완이 필요하며, 이를 통해 직업성으로 발생할 수 있는 천식의 AOP 확립의 기반을 다질 수 있을 것으로 여겨진다.

V. 결론

.....

V. 결론

직업성 알러지성 호흡기질환(천식 등)은 화학물질, 곡물 분진 등 작업장 내 다양한 물질에 노출되어 항원에 의한 알레르기 반응을 일으키는 면역성 질환의 일종으로, 유병 근로자를 확인하기 위한 현재의 임상 기준 검사들은 비용 및 검사기간 등의 이유로 진단 및 직업성 여부를 확인하기 어려움이 있다. 이러한 직업성 천식을 초기 진단하기 위한 방법의 하나로 대체시험법의 개념에서 이용되는 AOP를 적용하여 화학물질에 의한 생체 내 변화를 확인하고자 하였다.

이에 지난 연구(화학물질에 의한 면역성 질환의 AOP 적용 연구)를 통해 직업성 알러지성 호흡기질환에 적용할 수 있는 AOP 지도 경로 및 초기 진단을 위한 유용한 마커를 탐색하였다. 그러나 제안된 AOP 및 마커를 질환에 적용하기 위해서 실질적인 실험 검증 연구가 필요하여, 이번 연구를 통해 AOP를 이용하여 직업성 알러지성 호흡기질환에 관련된 독성 메커니즘 및 유용한 마커 등을 실험적 검증하여, 질환 관련 지표를 실험적 탐색 및 제시하고자 하였다.

최근 업데이트된 직업성 알러지성 호흡기질환과 관련 AOP의 일부 내용 중 AO를 유발하는 첫 단계인 MIE가 변경되었음을 확인하였고, 이는 기존의 lysine residue로 한정되었던 공유결합의 범위를 제한하지 않고 확대하여 추가적인 화학물질에 의한 AO의 시작 가능성을 제시하였다.

또한 실험적 증빙을 통한 지난 연구과제 제안 AOP 및 관련 KE의 확인하고자 하였다. *in vitro* 실험을 통해 제안된 직업성 알러지성 호흡기 질환 AOP 내용의 실험적 확인을 위해 저분자화합물 위주의 시험 물질을 선정 후 사람 호흡기 세포의 3D-cell model을 이용하여 세포 독성, 산화적 손상 관련 지표 및 염증 관련 cytokine/chemokines을 탐색하고, 구성 조직의 형태적 변화를 확인하였다. 저분자량 직업성 천식 유발물질 중 노출 보고가 많은

메틸렌 다이페닐 다이아이소시아네이트(Methylene Diphenyl diisocyanate, MDI), 톨루엔 다이소시아네이트(Toluene diisocyanate, TDI) 및 트리멜리트산무수물(Trimellitic anhydride, TMA)을 시험 물질로 사용하여, 각 시험 물질에 의한 3D-cell model 에서의 LDH (lactate dehydrogenase) 활성 분석을 통해 세포 누출 손상 결과를 확인하였으며, 세포 손상이 심한 48시간의 결과를 제외하고 각 호흡기계 모델에서 시험물질에 의한 농도별 세포 손상을 확인할 수 있었다.

또한 산화적 손상 관련 변화로 천식 환자 하부 호흡기계 모델의 경우 시험 물질 투여에 의한 ROS/RNS양의 뚜렷한 증가를 확인할 수 있었고, 정상인 상부호흡기계 모델에서는 24시간 및 48시간에서 TDI 농도 별 증가가 확인되었고, MDI 및 TMA는 대조군에 비해 증가하였으며, 정상인의 하부호흡기계 모델에서 48시간에서 모든 시험 물질에 의한 증가가 확인되었다.

추가적으로 기도 내 재구성과 염증 관련 지표를 알아보기 위해 다양한 종류의 cytokine 및 chemokine 정도를 측정하였으나, 정상인의 각 호흡기계 모델에서 시험물질 노출에 의해 cytokine 및 chemokine의 특정할 만한 변화는 보이지 않았다.

조직병리학적 검사를 통해 시험 물질 노출에 의한 각 단면의 세포 손상 정도에 따른 상피 세포의 높이 변화, 상피 탈락, 비정형 변성, 증식 등의 변화 및 점액분비 변화를 확인하였다.

결론적으로, 이번 연구를 통해 인체 호흡기계 세포로 구성된 3D-cell model을 통해 직업성 천식 관련 제안된 AOP 및 KE를 실험적으로 확인하였다. MDI, TDI 및 TMA에 의한 호흡기계 세포 자극 및 손상이 확인되었고, 이와 관련되어 산화적 손상의 지표인 ROS/RNS의 변동을 확인할 수 있었으나, 다음 단계로 제안된 생체 내 cytokine 및 chemokine의 명확한 변화는 밝혀지지 않아, 구성 세포 내 유전체 분석이나 면역관련 세포의 co-culture를 통한 호흡기계 모델을 이용한 추가적 실험적 증빙이 필요할 것으로 여겨진다.

참고문헌

- 조은상, 차효근. (2020) 화학물질에 의한 면역성 질환의 AOP 적용 연구. 산업안전보건연구원.
- Balharrry, D., Sexton, K., B'erub'e, K.A., 2008. An in vitro approach to assess the toxicity of inhaled tobacco smoke components: nicotine, cadmium, formaldehyde and urethane. *Toxicology* 244, 66-76.
- Balogh Sivars K, Sivars U, Hornberg E, et al., A 3D Human Airway Model Enables Prediction of Respiratory Toxicity of Inhaled Drugs In Vitro. *Toxicol Sci.* 2018;1:162(1):301-308
- Beubler E. Fischer R. Untersteiner G. et al., Influence of the surfactant tyloxapol on mucociliary clearance in human respiratory cystic fibrosis cells. *Pharmacology*, 2016;98:1-3
- Blume C, Davies DE. In vitro and ex vivo models of human asthma. *Eur J Pharm Biopharm* 2013;84(2):394-400
- Brooks SM, Truncale T, McCluskey J. Occupational and environmental asthma. In: Rom WN, Markowitz SB, editors. *Environmental and occupational medicine*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2007. p. 418-63.

- Browne P, Noyes PD, Casey WM et al., Application of Adverse Outcome Pathways to U.S. EPA's Endocrine Disruptor Screening Program. *Environ Health Perspect.* 2017;125(9):096001
- Burge PS, Moore VC, Robertson AS. Sensitization and irritant-induced occupational asthma with latency are clinically indistinguishable, *Occup Med.* 2012;62(2):129-133
- Chauhan V, Said Z, Daka J et al (2019) Is there a role for the adverse outcome pathway framework to support radiation protection? *Int J Radiat Biol* 95(2):225-232
- Chortarea S, Barosova H, Clift MJD et al., Human asthmatic bronchial cells are more susceptible to subchronic repeated exposures of aerosolized carbon nanotubes at occupationally relevant doses than healthy cells. *ACS Nano*, 2017;11:7615-7625
- Clippinger AJ, Allen D, Behrsing H. et al., Pathway-based predictive approaches for non-animal assessment of acute inhalation toxicity. *Toxicol. Vitro*, 2018;52:131-145
- Coady K, Browne P, Embry M et al (2019) When are adverse outcome pathways and associated assays "fit for purpose" for regulatory decision-making and management of chemicals? *Integr Environ Assess Manag* 15(4):633-647.

- Daniel L. Villeneuve, Doug Crump, Natalia Garcia-Reyero, Markus Hecker, Thomas H. Hutchinson, Carlie A. LaLone, Brigitte Landesmann, Teresa Lettieri, Sharon Munn, Malgorzata Nepelska, Mary Ann Ottinger, Lucia Vergauwen, and Maurice Whelan. Adverse Outcome Pathway (AOP) Development I: Strategies and Principles. *Toxicol Sci.* 2014. 142(2): 312-320.
- Dean CH, and Snelgrove RJ. New Rules for Club Development: New Insights into Human Small Airway Epithelial Club Cell Ontogeny and Function. *Am J Respir Crit Care Med.* 2018;198(11):1355-1356
- EPA(Environmental protection agency). Strategic plan to promote the development and implementation of alternative test methods within the TSCA program.
- Escher SE, Kamp H, Bennekou SH. et al. Towards grouping concepts based on new approach methodologies in chemical hazard assessment: the read-across approach of the EU-ToxRisk project. *Arch Toxicol.* 2019;93:3643-3667
- Huang S, Wiszniewski L, Constant S. et al., Potential of in vitro reconstituted 3D human airway epithelia (MucilAir™) to assess respiratory sensitizers. *Toxicol. In Vitro.* 2013;27:1151-1156
- Ian Kimber, Alan Poole and David A. Basketter. Skin and respiratory chemical allergy: confluence and divergence in a hybrid adverse outcome pathway. 2018. *Toxicol Res.* 2018;7:586-605

- Jeong J, Song T, Chatterjee N, Choi I, Cha YK, Choi J (2018) Developing adverse outcome pathways on silver nanoparticle-induced reproductive toxicity via oxidative stress in the nematode *Caenorhabditis elegans* using a Bayesian network model. *Nanotoxicology*. 12(10):1182
- Kavlock RJ, Bahadori T, Barton-Maclaren TS, Gwinn MR, Rasenberg M, Thomas RS. Accelerating the Pace of Chemical Risk Assessment. *Chem Res Toxicol*. 2018;31(5):287-290.
- Kim SR, Lee JH. Biologic agents for asthma treatment. *Allergy Asthma Respir Dis*. 2019;7(1):3-12
- Kim SH, Choi GS, Ye YM et al., Toluene di-isocyanate (TDI) regulates haem oxygenase-1/ferritin expression: implications for toluene di-isocyanate-induced asthma. *Clin Exp Immunol*. 2010;160:489-497
- Lantz RC, Lemus R, Lange RW, et al., Rapid reduction of intracellular glutathione in human bronchial epithelial cells exposed to occupational levels of toluene di-isocyanate. *Toxicol Sci*. 2001;60:348-355
- Mattoli S, Colotta F, Fincato G. et al., Time course of IL1 and IL6 synthesis and release in human bronchial epithelial cell cultures exposed to toluene diisocyanate. *J cell Physiol*. 1991;149(2):260-268

- Moné MJ, Pallocca G, Escher SE, et al., Setting the stage for next-generation risk assessment with non-animal approaches: the EU-ToxRisk project experience. *Arch Toxicol*. 2020;94:3581-3592
- OECD (2016) Guidance Document for the Use of Adverse Outcome Pathways in Developing Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA). Series on Testing & Assessment No 260.
- OECD (2018) Users' Handbook supplement to the Guidance Document for developing and assessing Adverse Outcome Pathways. OECD Series on Adverse Outcome Pathways No 1.
- OECD (2021), AOP wiki. AOPs. <https://aopwiki.org/aops>
- Parish ST, Aschner M, Casey W, et al., An evaluation framework for new approach methodologies (NAMs) for human health safety assessment. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2020;112:104592
- Pervaiz S, Clement MV. Superoxide anion: oncogenic reactive oxygen species? *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(7-8):1297-304
- Pralong JA, Cartier A. Review of Diagnostic Challenges in Occupational Asthma. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2017;17(1):1
- Prantil-Baun R, Novak R, Das D, Somayaji MR, Przekwas A, Ingber DE. Physiologically Based Pharmacokinetic and Pharmacodynamic

- Analysis Enabled by Microfluidically Linked Organs-on-Chips. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2018;6:58:37-64
- Punt A, Bouwmeester H, Blaauboer BJ, et al., New approach methodologies (NAMs) for human-relevant biokinetics predictions. *ALTEX*. 2020;37(4):607-622
- Rugard M, Coumoul X, Carvaillo JC, Barouki R, Audouze K (2020) Deciphering adverse outcome pathway network linked to bisphenol F using text mining and systems toxicology approaches. *Toxicol Sci* 173(1):32-40.
- Sullivan KM, Enoch SJ, Ezendam J. et al., An Adverse Outcome Pathway for Sensitization of the Respiratory Tract by Low-Molecular-Weight Chemicals: Building Evidence to Support the Utility of In Vitro and In Silico Methods in a Regulatory Context. *Applied In Vitro Toxicology* 2017;3(3):213-226
- Valstar DL, Schijf MA, Stelekati E. et al., Trimellitic anhydride-conjugated serum albumin activates rat alveolar macrophages in vitro. *J Occup Med Toxicol*. 2006; 1.1 (2006): 1-8.
- Vock EH, Vamvakas S, Gahlmann R, Lutz WK (1998) Investigation of the induction of DNA doublestrand breaks by methylenediphenyl-4,4'-diisocyanate in cultured human lung epithelial cells. *Toxicol Sci* 46: 83-8211; 89

- Welch J, Wallace J, Lansley AB, Roper C. Evaluation of the toxicity of sodium dodecyl sulphate (SDS) in the MucilAir™ human airway model in vitro. Regul Toxicol Pharmacol. 2021;125:105022
- Wittwehr C, Aladjov H, Ankley G et al (2017) How adverse outcome pathways can aid the development and use of computational prediction models for regulatory toxicology. Toxicol Sci 155(2):326-336.
- Zhelev Z, Ivanova D, Bakalova R, Aoki I, Higashi T. Synergistic Cytotoxicity of Melatonin and New-generation Anticancer Drugs Against Leukemia Lymphocytes But Not Normal Lymphocytes. Anticancer Res. 2017 Jan;37(1):149-159.
- Zuo WL, Shenoy SA, Li S. et al., Ontogeny and biology of human small airway epithelial club cells. Am J Respir Crit Care Med. 2018;198:1375-1388

Abstract

- **Key words** : AOP, Occupational asthma, chemicals, respiratory diseases, reactive oxygen species
- **Title** : Allergic respiratory diseases linked with AOP caused by chemicals in the workplace

Objectives : Occupational allergic respiratory disease (occupational asthma) is an immune disease caused by antigens in the workplace. For the initial detection of this disease, we tried to identify the disease mechanism and markers using AOP, which is being developed as part of an animal replacement experiment.

Methods : Using a 3D-cell model constructed with human respiratory cells(Mucilair™, Smallair™, Smarllair™-asthma), the cytotoxicity, oxidative damage-related and inflammation-related indicators of MDI, TDI, and TMA were examined, and morphological changes of the constituent tissues were confirmed.

Results : Cell damage caused by the test substance was confirmed in each respiratory system model d 24 hours or 48 hours after administration of the test substance using the Mucilair, Smallair and Smallair-asthma models. In addition, an increase in ROS/RNS by the test substance by model and time was confirmed, but clear changes in cytokines and chemokines were not confirmed. Morphological changes

and mucus secretion changes of each model were confirmed through histopathological examination.

Conclusion : AOP and KE related to occupational asthma were experimentally confirmed through a 3D-cell model composed of human respiratory system cells. Indices of respiratory system cell stimulation and damage and oxidative damage by each substance were changed. However, the next phase of cytokine and chemokine changes is not clear, so it is considered that additional experimental evidence is needed.

연구진

연 구 기 관 : 산업안전보건연구원

연구책임자 : 조은상 (연구위원, 산업화학연구실)

연 구 원 : 차효근 (과장, 산업화학연구실)

연구기간

2021. 01. 01. ~ 2021. 11. 30.

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

산업안전보건연구원장

**사업장 내 화학물질에 의한 알려지성 호흡기질환의 AOP 연계 연구
(2021-산업안전보건연구원-843)**

발 행 일 : 2021년 11월 30일

발 행 인 : 산업안전보건연구원 원장 김은아

연구책임자 : 산업화학연구실 연구위원 조은상

발 행 처 : 안전보건공단 산업안전보건연구원

주 소 : (44429) 울산광역시 중구 종가로 400

전 화 : 052-703-0500

팩 스 : 052-703-0500

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

I S B N : 979-11-92138-29-9