

서로 다른 물리화학적 특성을 갖는 탄소나노튜브(CNT)의 생물학적 독성 분석

김수남[†], 강민성[†], 한영아[†], 김재환[†], 노진규[‡], 김영훈[‡], 최상돈*, 박은정*

아주대학교 분자과학기술학과
443-749 경기도 수원시 영통구 원천동 산 5
[†]한국화학연구원 부설 안전성평가연구소
580-185 전라북도 정읍시 신정동 1051
[‡]광운대학교 화학공학과
139-701 서울특별시 노원구 월계동 447-1

(2011년 7월 14일 접수; 2011년 8월 21일 1차 수정본 접수; 2011년 9월 16일 2차 수정본 접수; 2011년 9월 18일 채택)

Toxicity Analysis of Carbon Nanotubes Based on Their Physicochemical Properties

Soo Nam Kim[†], Min Sung Kang[†], Young-Ah Han[†], Jae Hwan Kim[†],
Jinkyu Roh[‡], Younghun Kim[‡], Sangdun Choi*, and Eun-Jung Park*

Department of Molecular Science and Technology, Ajou University, San 5, Woncheon-dong, Yeongtong-gu, Suwon 443-749, Korea
[†]Inhalation Toxicology Center, KIT Jeongeup Campus, 1051, Shinjeong-dong, Jeongeup 580-185, Korea
[‡]Department of Chemical Engineering, Kwangwoon University, 447-1 Wolgye-dong, Nowon-gu, Seoul 139-701, Korea

(Received for review July 14, 2011; 1st Revision received August 21, 2011; 2st Revision received September 16, 2011; Accepted September 18, 2011)

요 약

제조나노물질은 원료물질이 동일하더라도 제조방법에 따라 최종생산물의 물리화학적 특성은 매우 상이해질 수 있고 더불어 독성 또한 크게 달라질 수 있을 것으로 추정되고 있다. 본 연구에서 우리는 2종의 탄소나노튜브(단층벽 탄소나노튜브 및 다층벽 탄소나노튜브)를 마우스에 경구와 경기관지로 처리한 후 체중당 상대무게 및 염증반응 지표를 조사함으로써 길이와 전기전도성에 따른 독성을 동정하였다. 실험 결과, 다층벽 탄소나노튜브의 경우 체중 감소는 길이가 짧은 그룹에서 더 강하게 관찰된 반면, 염증 반응은 비교적 길이가 긴 그룹에서 더 강하게 유도되었다. 경기관지로 처리된 단층벽 탄소나노튜브는 뇌와 신장의 상대무게를 의미있게 감소시켰고, 기관지 세척액과 혈액 내 면역세포의 의미있는 변화는 처리 후 1일과 7일에서 주로 관찰되었다. 이 결과를 통해 길이, 입경, 층벽의 수와 같은 탄소나노튜브의 물리화학적 특성이 물질에 의한 독성과 염증 반응에 매우 중요한 인자로 작용하고 있음을 확인할 수 있었다.

주제어 : 제조나노물질, 탄소나노튜브, 독성, 염증반응

Abstract : The physicochemical properties of manufactured nanomaterials can vary depending upon the methods of manufacture, although the utilized raw materials are same. Hence, the toxicity can also vary based on the methods of nanomaterials manufacture. In this study, we compared the toxicity effect of two types of CNTs (MWCNT, multi-walled carbon nanotube; SWCNT, single-walled carbon nanotube) that differ in length and wall number. In case of MWCNTs, inflammatory responses were more strongly induced in longer groups, whereas body weights more clearly decreased in shorter groups. SWCNT significantly decreased the relative weights of brain and kidney, and the inflow of immune cells and the hematological changes were observed significantly on day 1 and day 7 after exposure, respectively. Our results showed that the length and wall number of CNTs can serve as critical factors in the exhibited inflammation and toxicity.

Keywords : Carbon nanotube, Inflammation, Manufactured nanomaterials, Toxicity

1. 서 론

과학기술의 발전과 더불어 새로운 물질에 대한 노출의 기회가 빈번해짐에 따라 그 유해성에 대한 관심 또한 고조되고 있다. 제조나노물질의 경우도 그러한 예 중 하나이며, 21세기 들어 제조나노물질은 높은 전기전도성, 강도, 지속기간, 화학

* To whom correspondence should be addressed.

E-mail: sangdunchoi@ajou.ac.kr, pejtoxic@daum.net

이 논문은 한국연구재단 지정 중점연구소, 아주대학교 분자과학기술 연구센터 특집으로 투고되었습니다.

반응 등 독특한 물리화학적 특성으로 인해 전기/전자, 통신, 재료/제조, 의료/생명공학, 환경/에너지, 국방, 항공우주 등 그 응용범위가 급속도로 증가하고 있음에도 불구하고 독성에 관한 연구는 매우 더디게 진행되고 있다[1-3].

경제협력개발기구(OECD, Organization for Economic Cooperation and Development)에서는 2007년부터 단층벽 탄소나노튜브(SWCNT, single-walled carbon nanotube), 다층벽 탄소나노튜브(MWCNT, multi-walled carbon nanotube), 플러렌, 티타늄, 철 등을 포함하는 우선관리대상 나노물질 14종을 선정하고 각 물질 별로 lead sponsor, co-sponsor, contributor등을 지정하여 독성자료의 수집, 생산 등을 총괄하게 하고 있으며, 2008년부터 본격적으로 시행되고 있는 GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals)에서는 생산된 제품의 원료물질과 더불어 최종산물에 함유된 성분의 독성자료도 요구하고 있다. 그러나, 제조나노물질의 경우 기존의 일반 화학물질과는 달리 원료물질이 동일하더라도 제조방법에 따라 최종 생산된 나노물질의 물리화학적 특성은 매우 상이해질 수 있으므로 원료물질이 동일하더라도 최종산물의 독성결과를 동일하다고 평가하는 데는 많은 한계가 있을 것으로 판단되어 기존의 독성분류 방식을 보완할 방안을 마련하고자 많은 노력을 기울이고 있다. 본 연구에서는 나노물질의 응용분야의 확대에 의한 노출경로의 다양화를 반영하기 위하여 서로 다른 길이와 wall number를 갖는 단층벽 탄소나노튜브와 다층벽 탄소나노튜브를 경구 및 경기관지로 주입한 후 일어나는 체중변화, 각 조직의 상대무게 변화, 염증반응 등을 관찰함으로써 탄소나노튜브의 길이나 wall number가 독성에 미치는 영향을 조사해보고자 하였다.

2. 실험

2.1. 시험물질

서로 다른 길이(240, 394, 3,088, 6,261 nm)의 다층벽 탄소나노튜브는 서울대학교 화학생명공학부 이종협 교수 실험실에서 제공받았다. 도체와 반도체 성분으로 이루어진 단층벽 탄소나노튜브로부터 산을 이용하여 반도체 성분만을 분리하는 작업은 광주대학교 화학공학과 김영훈 교수 실험실에서 수행하였으며 복합성분과 반도체 성분의 단층벽 탄소나노튜브의 평균길이는 각각 760과 1,000 nm였다.

2.2. 실험동물 및 사육환경

5주령 ICR마우스를 (주) 오리엔트바이오(경기도 성남)로부터 공급받아 2주일 간 순화 후 본 실험에 사용하였다. 실험동물의 사육환경은 온도 $23 \pm 3^\circ\text{C}$, 상대습도 $55 \pm 10\%$, 환기횟수 10~20회/hr, 조명주기 12시간(08:00~20:00), 조도 150~300 Lux로 조절되었으며, 순화, 검역, 투여 및 관찰기간 동안 스테인레스제 망사육상자(255 W \times 465 L \times 200 H mm)에 수용하여 사육하였다. 실험에 사용된 모든 동물은 방사선 조사된 실험동물용 고형사료(P.M.I.)와 음수(여과 멸균정제수)를 자유 급식하도록 하였다. 또한, 동물의 개체식별은 tail tattoo 표시법으

로 실시하였다. 본 시험에 적용되는 모든 수순은 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)에 의해 검토되어 실시되었다.

2.3. 시험물질 투여

다층벽 탄소나노튜브의 길이에 따른 독성을 비교하기 위하여 용매대조군 및 처리군(240, 394, 3,088, 6,261 nm) 모두 각각 5마리씩 15일간 5 mg/kg의 농도로 1일 1회 경구로 투여하였으며, 성별에 따른 독성을 비교하기 위하여 3,088 nm의 1.25, 2.5, 5 mg/kg의 다층벽 탄소나노튜브를 암/수 각각 7마리씩 15일간 1일 1회 경구투여 하였다.

단층벽 탄소나노튜브의 처리는 GLP (Good Laboratory Practice)시스템 하에서 안전성평가연구소의 SOP (Standard Operating Procedure)에 따라 100 $\mu\text{g/kg}$ 의 단층벽 탄소나노튜브를 경기관지로 단회 투여되었으며, 처리 후 1, 7, 14 및 28일에 추후 시험에 필요한 시료를 회수하였다.

2.4. 체중 및 장기무게 측정

순화기간의 경우 1일 1회 일반증상관찰을 실시하였으며, 투여기간에는 1일 2회로, 투여 전 및 후에 관찰하였다. 체중은 투여개시 전에 1회, 투여기간에는 주 1회씩 및 부검 전에 그룹별로 측정하였다.

계획도살 시까지 생존한 모든 동물 및 빈사 또는 사망동물에 대하여 부검 후 간, 폐, 뇌, 흉선, 심장, 신장(좌, 우), 비장, 자궁 및 고환(좌, 우) 등의 절대 장기중량을 측정하고, 부검 전 절식된 체중에 대한 상대 장기중량을 산출하였다.

2.5. 혈액학적 검사

최종부검 시에 모든 생존동물에 대해서 후대정맥에서 채혈하여 채혈된 혈액 약 0.5 mL을 EDTA-2K 함유 채혈병에 분주하여 White blood cell count (WBC), Red blood cell count (RBC), Hemoglobin concentration (HGB), Hematocrit (HCT), Mean corpuscular volume (MCV), Mean corpuscular hemoglobin (MCH), Mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), Platelet (PLT), Neutrophils, Lymphocytes, Monocytes, Eosinophils, Basophils, Large unstained cells, Reticulocyte에 대해 혈구자동계측장치(ADVIA120 Hematology system, Bayer, USA)를 이용하여 검사하였다.

2.6. Broncho-alveolar lavage (BAL) fluid 채취

멸균 식염수 1 mL을 기관지를 통하여 1회 왕복하여 채취하는 방법으로 2회 채취한 후 동일한 방법으로 2회 더 채취하였다. 처음 2회 채취한 시료를 원심분리(3,000 rpm, 10분)하여 얻어진 상등액은 사이토카인 측정을 위해 보관하였으며, 세 포는 2차로 회수한 분획과 혼합하여 Cell Viability Analyzer (Vi-CELLTM, Beckman Coulter)로 총 세포 수를 측정하였고, 가라앉은 세포들을 재부유시켜 Wright-Giemsa로 염색한 후 Shandon Cytospin 4 (Thermo)를 이용하여 면역세포 수를 측정하였다.

2.7. 혈액 내 사이토카인 측정

혈액 내 사이토카인 농도는 시판 중인 ELISA kit (eBio-science, San Diego, CA, USA)을 이용하여 제조회사의 매뉴얼에 따라 실행하였다. 간략히 기록하면, 96 well plate에 assay dilution으로 희석한 capture antibody를 100 μ L씩 분주한 후, 4 $^{\circ}$ C에서 overnight하였다. Well plate을 세척하고 assay dilution으로 1시간 동안 실온에서 blocking한 후 대조군과 나노입자 처리군으로부터 준비된 혈청과 standard를 각 well에 넣고 2시간 동안 실온에서 방치하였다. 다시 세척 후, biotin-conjugated detecting mouse antibody를 넣고 1시간 동안 반응시킨 후 avidin-HRP를 넣고 30분 동안 실온에서 방치하였다. TMB 용액을 넣고 15분이 경과한 후, 1 M H_3PO_4 를 넣어 반응을 종료시켰다. ELISA reader기 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 사이토카인의 양은 표준곡선을 적용하여 계산되었다[11,12].

2.8. 통계처리

모든 실험결과와 통계처리는 각 실험군의 평균 \pm 표준편차로 나타내었으며, 각 군의 비교는 $p < 0.05$ 및 0.01 수준에서 one-way ANOVA test를 하였고, 군 간의 평균차이에 대한 유의성 검정은 Dunnett's test를 이용하여 검증하였다.

3. 결과

3.1. 다층벽 탄소나노튜브의 길이에 따른 독성비교

3.1.1. 체중변화 비교

길이가 서로 다른 4종의 다층벽 탄소나노튜브를 15일간 경

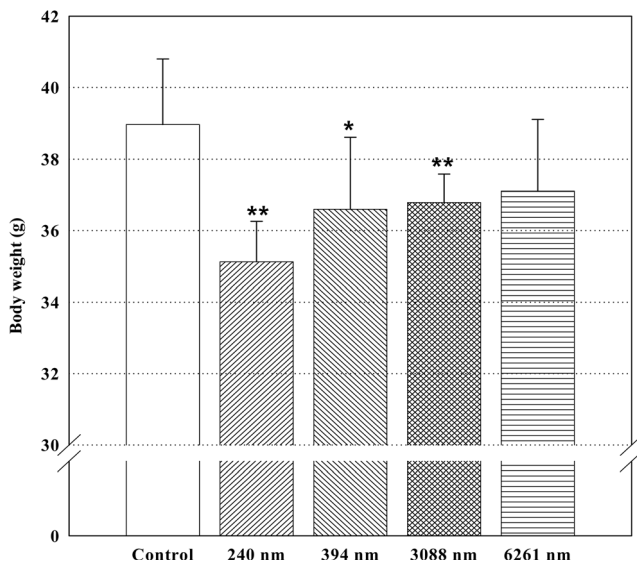


Figure 1. A comparison of growth rates with the length of MWCNTs. Mice (5/group) were orally treated to a concentration of 5 mg/kg with MWCNTs of different lengths (240, 394, 3,088, 6,261 nm) for 15 days. Control was replaced by vehicle control. Error of weight between groups on experiment starting day was ± 0.5 g. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

구로 투여한 후 각 그룹의 체중을 측정한 결과(Figure 1), 길이가 짧아질수록 체중감소가 더욱 뚜렷하게 관찰되었다. 즉, 용매대조군의 경우 부검일의 체중은 38.97 ± 1.83 g인데 반해, 240, 394, 3,088, 6,261 nm로 처리한 그룹의 체중은 각각 35.13 ± 1.13 g, 36.60 ± 2.02 g, 36.79 ± 0.80 g, 37.11 ± 2.01 g로 측정되었다.

3.1.2. 체중당 조직무게 비교

동일한 그룹에 대해 체중에 대한 조직의 무게비를 비교한 결과(Figure 2), 240 nm로 처리한 그룹의 흉선무게(0.0017 ± 0.0002 g)가 용매대조군에 비해 의미 있게 증가되었고(0.0015 ± 0.0001 g), 240과 6,091 nm로 처리한 그룹의 신장 무게가 각각 0.0166 ± 0.0011 g과 0.0170 ± 0.0007 g으로 용매대조군(0.0177 ± 0.0020 g)에 비해 감소되었으며, 3,088 nm로 처리한 그룹의 고환무게(0.0053 ± 0.0006 g)가 대조군(0.0058 ± 0.0005 g)에 비해 의미 있게 감소되었다.

3.1.3. 사이토카인 분비량 비교

다층벽 탄소나노튜브길이에 따른 염증반응 정도를 비교하기 위하여 그룹별로 혈액 내 IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, TGF-beta 농도를 측정한 결과, Figure 3에서 보이는 바와 같이 측정한 모든 사이토카인의 농도가 모든 처리군에서 용매대조군에 비해 의미 있게 높게 검출되었다. 그러나 IL-5, IL-10, TGF-beta의 검출농도는 모든 그룹에서 매우 낮은 수준이었으며, IL-12는 길이가 길어질수록 분비량이 증가한 반면, IL-4는 3,088 nm로 처리한 그룹에서 가장 높게 검출되었다.

3.2. 성별에 따른 다층벽 탄소나노튜브의 독성 비교

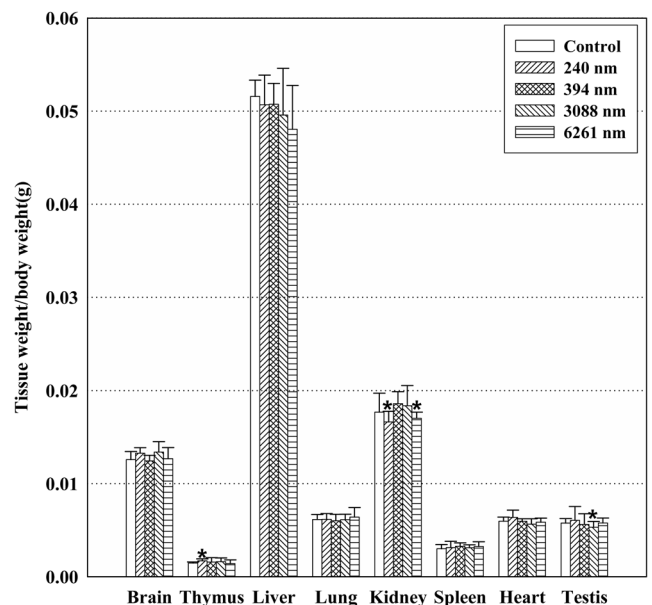


Figure 2. A comparison of relative organ weight with the length of MWCNTs. Relative weight of each tissue was computed from the formula (tissue weight/body weight). *, $P < 0.05$.

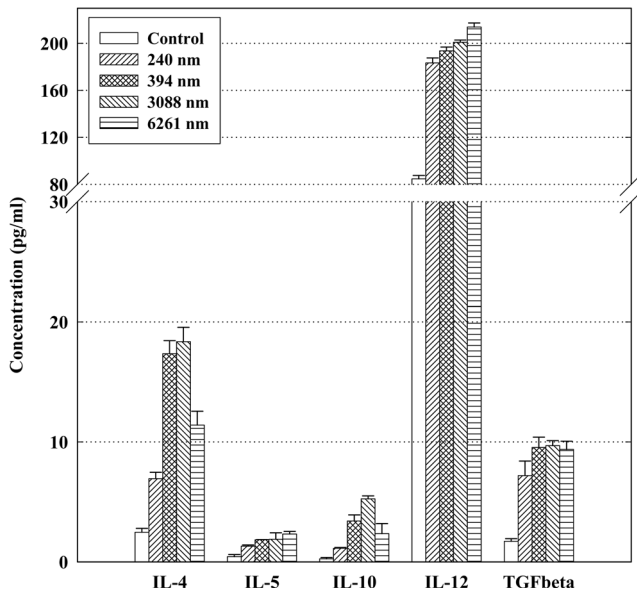


Figure 3. A comparison of cytokine concentration in blood stream with the length of MWCNTs. Blood was harvested at 24 hours after final treatment and was pooled by group after centrifuge. The measured cytokines were significantly detected in all treated groups relative to vehicle control. **, $P < 0.01$.

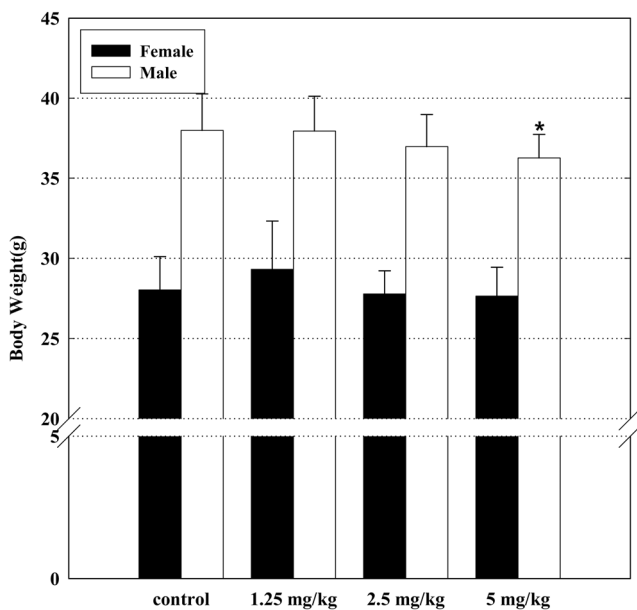


Figure 4. Comparison of body weight according to sex differences after MWCNT exposure. Mice (7/group) were orally treated to concentrations of 1.25, 2.5, 5 mg/kg with MWCNTs (3088 nm) for 15 days. Control was replaced to vehicle control. Error of weight between groups on experiment starting day was ± 0.4 g. *, $P < 0.05$.

암컷과 수컷 각각에 3,088 nm의 다층벽 탄소나노튜브를 15일간 경구로 투여한 결과, Figure 4에서 보는 바와 같이 암컷의 체중은 용매대조군에 비해 의미 있는 변화가 관찰되지 않은 반면, 수컷의 경우는 5 mg/kg으로 처리한 그룹(36.26 ± 1.47

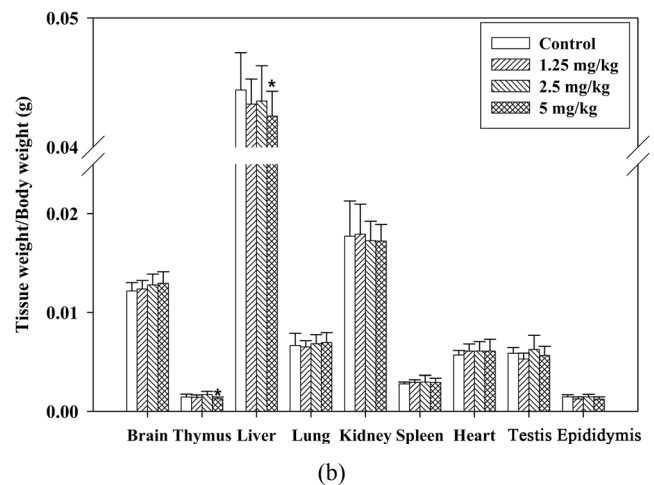
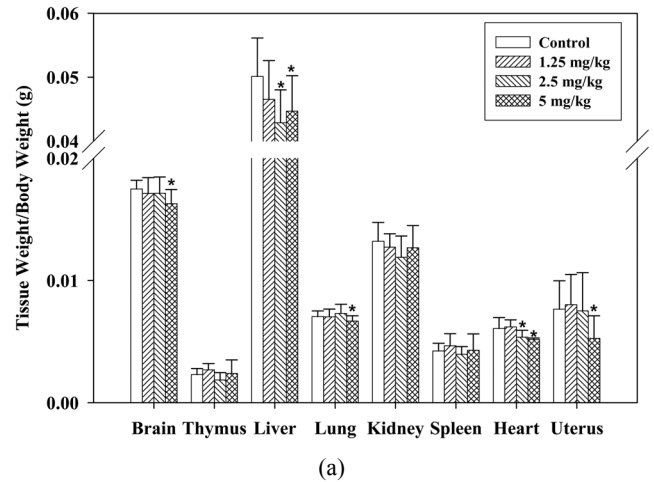


Figure 5. Change of relative organ weight after MWCNT exposure (female). Relative weight of each organ was computed from the formula (tissue weight/body weight). (a) Female, (b) Male, *, $P < 0.05$.

g)에서 용매대조군(37.98 ± 2.28 g)에 비해 의미 있는 감소가 관찰되었다.

더 나아가, 암컷의 경우는 3,088 nm의 다층벽 탄소나노튜브를 5 mg/kg으로 처리한 그룹의 뇌(0.0176 ± 0.0014 g : 0.0164 ± 0.0011 g), 간(0.05 ± 0.0031 g : 0.0446 ± 0.0020 g), 폐(0.0123 ± 0.0138 g : 0.0071 ± 0.0007 g), 심장(0.0060 ± 0.0006 g : 0.0051 ± 0.0001 g), 자궁(0.0076 ± 0.0019 g : 0.0052 ± 0.0015 g)과 2.5 mg/kg으로 처리한 그룹의 간(0.0428 ± 0.0040 g), 심장(0.0053 ± 0.0005 g)에서 용매대조군에 비해 의미 있는 상대조직무게비의 감소가 관찰된 반면, 수컷의 경우는 5 mg/kg으로 처리한 그룹의 흉선(0.0015 ± 0.0003 g : 0.0013 ± 0.0002 g)과 간(0.0444 ± 0.0029 g : 0.0424 ± 0.0019 g)에서만 의미 있는 감소가 관찰되었다(Figure 5).

3.3. 단층벽 탄소나노튜브의 독성관찰

3.3.1. 시간에 따른 체중변화

복합성분(반도체와 도체)으로 이루어진 단층벽 탄소나노튜브를 경기관지로 처리한 후 1, 7, 14, 28일에서의 체중을

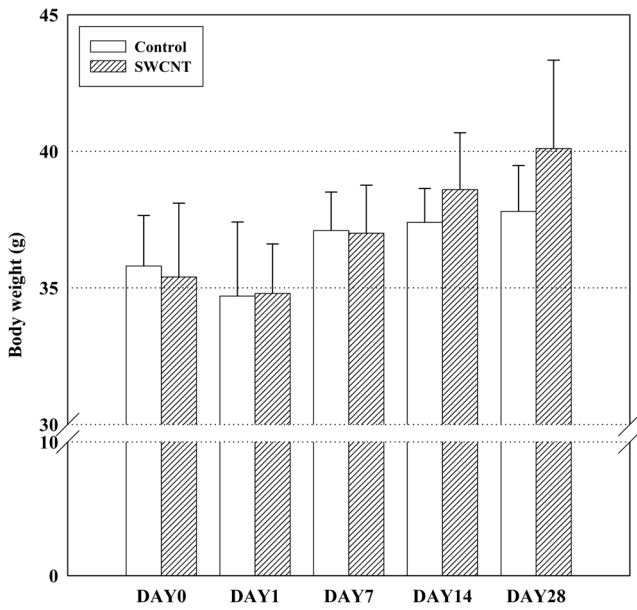


Figure 6. Change of body weight after SWCNT exposure. Mice (15/group) were given a single intratracheal dose of 100 µg/kg.

측정한 결과, 대조군에 비해 처리군에서 비교적 체중증가가 뚜렷한 경향을 나타내었으나 유의성 있는 변화는 관찰되지

않았다. 처리 후 28일에서의 체중은 용매대조군과 처리군에서 각각 37.8 ± 1.68 과 40.1 ± 3.24 g이었다(Figure 6).

3.3.2. 혈액학적 변화

단층벽 탄소나노튜브를 처리한 후 1, 7, 14, 28일에서의 혈액 내 세포구성을 관찰한 결과(Table 1), 처리 후 7일에서 용매대조군에 비해 WBC와 MCV 수가 의미 있게 감소된 반면, MCHC 수가 의미 있게 증가되었고, WBC내의 호중구 비의 감소와 림프구 비의 증가 또한 의미있게 관찰되었다.

3.3.3. 체중당 조직무게

단층벽 탄소나노튜브를 단회 경기관지로 처리한 후 1, 7, 14, 28일에서의 체중당 조직무게를 뇌, 폐, 흉선, 심장, 신장, 비장에서 관찰한 결과, 처리 후 1일과 7일에서는 뇌와 폐의 상대무게비가 처리군에 비해 의미 있게 감소되었으나 14일 이후로는 회복되는 경향을 나타내었다. 그러나, 신장의 무게는 처리 후 7일부터 28일까지 의미 있는 변화를 나타내었다(Table 2).

3.3.4. BAL fluid내 총세포수 및 구성비율

단층벽 탄소나노튜브를 처리한 후 1일과 28일에서 기관지 내 세포의 총 수 및 구성비를 관찰한 결과, Table 2에서 보는 바와 같이 처리 후 1일의 처리군에서 대조군에 비해 총세포

Table 1. Hematological changes after SWCNT exposures

	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT	RET	NEU	LYM	MON	EOS	BAS	LUC
	$\times 10^3/\mu\text{L}$	$\times 10^6/\mu\text{L}$	g/dL	%	fL	pg	g/dL	$\times 10^3/\mu\text{L}$	%	%	%	%	%	%	%
DAY Control	2.6 ± 0.3	8.0 ± 0.3	13.4 ± 0.4	39.3 ± 0.3	49.5 ± 1.5	16.9 ± 1.0	34.2 ± 1.2	1423 ± 242	3.3 ± 0.5	21.9 ± 8.8	71.6 ± 8.3	1.2 ± 0.4	4.3 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.5 ± 0.3
1 SWCNT	3.4 ± 0.8	8.1 ± 0.4	14.0 ± 0.7	39.7 ± 1.7	49.3 ± 2.2	17.3 ± 1.2	35.2 ± 1.2	1367 ± 123	3.4 ± 0.4	26.3 ± 4.1	67.1 ± 4.5	1.5 ± 0.9	3.9 ± 1.0	0.4 ± 0.1	0.7 ± 0.2
DAY Control	4.9 ± 0.5	8.4 ± 0.3	13.4 ± 0.4	43.6 ± 2.3	52.0 ± 1.7	16.1 ± 0.1	30.7 ± 1.0	1518 ± 21	5.6 ± 1.3	57.4 ± 2.3	38.8 ± 2.8	1.0 ± 0.2	2.3 ± 0.6	0.1 ± 0.1	0.4 ± 0.4
7 SWCNT	3.3 ± 0.7	8.7 ± 0.2	13.5 ± 0.6	41.4 ± 2.4	$47.7 \pm 2.1^*$	15.6 ± 0.4	$32.6 \pm 0.7^*$	1468 ± 83	4.4 ± 0.3	$13.8 \pm 3.6^*$	$81.2 \pm 5.0^*$	2.0 ± 0.7	2.4 ± 1.4	0.1 ± 0.0	0.5 ± 0.1
DAY Control	4.51 ± 1.2	8.3 ± 0.730	13.3 ± 1.4	40.6 ± 4.3	49.1 ± 1.5	16.1 ± 0.3	32.8 ± 1.0	1466 ± 259	4.3 ± 0.2	15.3 ± 7.3	80.2 ± 7.0	1.8 ± 0.2	2.0 ± 0.7	0.1 ± 0.1	0.6 ± 0.2
14 SWCNT	6.61 ± 1.9	8.6 ± 0.1	13.5 ± 0.4	42.6 ± 0.6	49.6 ± 0.3	15.7 ± 0.4	31.7 ± 0.8	1643 ± 242	5.0 ± 0.5	19.0 ± 1.0	76.2 ± 1.2	2.2 ± 0.2	1.2 ± 0.3	0.2 ± 0.0	$1.2 \pm 0.3^*$
DAY Control	4.3 ± 0.8	8.8 ± 0.2	13.4 ± 0.5	41.5 ± 1.0	47.3 ± 0.8	15.2 ± 0.3	32.1 ± 0.4	1442 ± 30	3.1 ± 0.2	15.5 ± 7.1	80.8 ± 7.0	2.0 ± 0.7	1.1 ± 0.2	0.0 ± 0.1	0.5 ± 0.2
28 SWCNT	3.0 ± 0.4	8.8 ± 0.8	13.5 ± 0.4	42.2 ± 1.5	48.1 ± 2.5	15.5 ± 0.9	32.1 ± 0.2	1571 ± 45	3.4 ± 0.5	14.2 ± 2.7	80.9 ± 2.9	2.7 ± 0.9	1.7 ± 0.7	0.1 ± 0.1	0.5 ± 0.4

*, $P < 0.05$

Table 2. Relative organ weight changes after SWCNT exposures

(Unit: g)

		Brain	Lung	Thymus	Heart	Kidney	Spleen
DAY 1	Control	1.371 ± 0.129	0.665 ± 0.211	0.132 ± 0.016	0.454 ± 0.041	1.524 ± 0.237	0.293 ± 0.044
	SWCNT	$1.288 \pm 0.014^*$	$0.541 \pm 0.031^*$	0.136 ± 0.034	0.480 ± 0.063	1.451 ± 0.174	0.269 ± 0.057
DAY 7	Control	1.357 ± 0.103	0.654 ± 0.092	0.110 ± 0.056	0.471 ± 0.033	1.639 ± 0.233	0.372 ± 0.115
	SWCNT	$1.247 \pm 0.071^*$	$0.580 \pm 0.051^*$	0.100 ± 0.034	0.477 ± 0.036	$1.446 \pm 0.179^*$	0.443 ± 0.281
DAY 14	Control	1.257 ± 0.057	0.529 ± 0.032	0.112 ± 0.024	0.407 ± 0.021	1.345 ± 0.090	0.297 ± 0.068
	SWCNT	1.185 ± 0.095	0.546 ± 0.052	0.117 ± 0.032	$0.461 \pm 0.040^*$	$1.484 \pm 0.162^*$	0.361 ± 0.114
DAY 28	Control	1.282 ± 0.088	0.507 ± 0.035	0.091 ± 0.010	0.446 ± 0.035	1.627 ± 0.164	0.281 ± 0.058
	SWCNT	1.247 ± 0.084	0.533 ± 0.046	0.106 ± 0.029	0.467 ± 0.026	$1.435 \pm 0.073^*$	0.279 ± 0.040

*, $P < 0.05$

Table 3. Changes in BAL cells after SWCNT exposures(Unit: $\times 10^6$ cells)

		Total cells ($\times 10^6$ uL)	Macrophage (%)	Neutrophils (%)	Lymphocytes (%)
DAY 1	Control	0.24±0.00	100	0±0.0	0±0.0
	SWCNT	0.75±0.19**	84.7±1.8**	15.3±3.1**	0±0.0
DAY 28	Control	1.26±0.10	100±3.4	0±0.00	0±0.00
	SWCNT	1.85±0.20**	99.0±2.7	2.6±1.1	0.7±0.2

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

수는 3.1배, 호중구의 비는 15.3배 증가되었다. 총 세포수의 증가는 28일에서 뚜렷하게 완화되었으나, 호중구와 림프구 비의 증가가 여전히 관찰되었다.

4. 결론

나노물질의 독성은 원료물질의 화학적 성분뿐만 아니라 제조과정에서 생성된 다양한 물리적 특성에 의해 좌우될 것으로 추정되고 있다. 탄소나노튜브 또한 제조과정에 따라 표면 화학, 길이, 조성, wall number에 있어 다양한 특성을 가지며, 길이, 금속함량, 금속의 조성, aggregation 또는 agglomeration 정도, 표면화학 등은 탄소나노튜브의 독성을 좌우하는 중요한 요인이 될 것으로 추정되고 있다[4-9]. 예를 들면, 산업적으로 생산된 코팅되지 않은 다층벽 탄소나노튜브(NT1), acid-based polymer로 코팅된 다층벽 탄소나노튜브(NT2), polystyrene-based polymer로 코팅된 다층벽 탄소나노튜브(NT3)를 각각 RAW264.7 세포주와 Balb/c mice에 처리한 결과, 다층벽 탄소나노튜브가 유도한 독성, 산화적 스트레스, 염증은 acid-based polymer코팅에 의해 증가된 반면, polystyrene-based polymer코팅에 의해서는 감소되었으며, 이 때 세 시료의 입경은 유사한 반면, 표면적은 두 코팅 시료에서 훨씬 작았다[10]. 또한, 서로 다른 크기의 다층벽 탄소나노튜브와 단층벽 탄소나노튜브를 동일한 농도로 처리했을 때, 단층벽 탄소나노튜브는 비교적 낮은 독성을 나타낸 반면, 길고 두꺼운 다층벽 탄소나노튜브는 가장 강한 DNA손상을 유도하였으며, 짧고 두꺼운 다층벽 탄소나노튜브와는 달리 길고 두꺼운 다층벽 탄소나노튜브의 복강투여는 복강액 내의 총세포수의 증가와 함께 강한 염증반응을 유도하였다[11]. 길이에 따른 독성반응 및 체내 잔존 정도를 관찰하기 위하여 15일 동안 경구로 반복 투여된 다층벽 탄소나노튜브는 길이가 짧을수록 체중증가를 감소시킨 반면, 길이가 길수록 보다 강한 염증반응을 유도하였다. 체중 및 체중당 조직무게의 변화가 시험물질의 독성유무를 추정하는데 중요한 지표로 활용되는 점을 감안할 때 길이가 긴 다층벽 탄소나노튜브에 의해 염증반응이 상대적으로 강하게 유도된 것은 길이가 길수록 영감이 용이해져 대식세포에 의한 탐식 및 제거가 어려워지기 때문일 것으로 추정된다[12-14]. 또한, 암컷과 수컷에 경구로 노출된 다층벽 탄소나노튜브는 주로 간과 심장의 무게에 영향을 주었으며, 이 결과를 바탕으로 우리는 간과 심장이 경구 노출된 다층벽 탄소나노튜브의 표적장기일 가능성에 대해 추가 연구가 필요할 것

으로 생각된다.

또한, 경기관지로 처리된 단층벽 탄소나노튜브는 처리 후 1일과 7일에서 뇌와 폐의 의미있는 상대무게 비 감소를 유도하였고, 신장의 무게는 처리 후 28일까지 대조군과 의미 있는 차이를 나타내었다. 혈액 내 면역세포의 변화는 처리 후 7일에서 주로 관찰되었으며, BAL fluid에서의 변화는 처리 후 28일까지 지속되었다. 다층벽 탄소나노튜브를 경기관지로 처리한 이전의 연구에서[15], 우리는 5, 20, 50 mg/kg의 다층벽 탄소나노튜브를 처리한 후 1일에서 총 세포수가 2내지 3배 증가하고, 호중구의 비율이 약 10 내지 19배 증가한다고 기록하였다. 또한, 지난 실험에서 사용된 다층벽 탄소나노튜브는 내입경(inner diameter)이 5 nm 이하였고, 외입경(outer diameter)은 110~170 nm 이하였으며, 길이는 5~9 μm 였던 반면, 이 연구에서 이용된 단층벽 탄소나노튜브는 입경이 1.2 nm이고, 평균 길이가 0.76 μm 였다[16]. 추후 입경과 길이에 따른 독성반응의 비교와 함께 기관지로 유입된 단층벽 탄소나노튜브가 뇌와 신장기능에 미치는 영향에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 판단되었다.

감 사

본 연구는 2011년도 식품의약품안전청 용역연구개발과제의 연구개발비 지원(10182 독성평 992-1302) 및 한국연구재단의 기초연구사업(2010-0015356)과 대학중점연구소 지원사업(2010-0028294)으로 수행된 연구이며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Ji, S. R., Liu, C., Zhang, B., Yang, F., Xu, J., Long, J., Jin, C., Fu, D. L., Ni, Q. X., and Yu, X. J., "Carbon Nanotubes in Cancer Diagnosis and Therapy," *Biochim. Biophys. Acta*, **1806**(1), 29-35 (2010).
2. http://www.oecd.org/document/50/0,3343,en_2649_37015404_42059634_1_1_1_37465,00.html
3. Lam, C. W., James, J. T., McCluskey, R., Arepalli, S., and Hunter, R. L., "A Review of Carbon Nanotube Toxicity and Assessment of Potential Occupational and Environmental Health Risks," *Crit. Rev. Toxicol. Mar.*, **36**(3), 189-217 (2006).
4. Yoshioka, Y., "Nanosafety Studies of Nanomaterials about Biodistribution and Immunotoxicity," *Yakugaku Zasshi.*, **131**(2), 221-224 (2011).

5. van derZande, M., Junker, R., Walboomers, X. F., and Jansen, J. A., "Carbon Nanotubes in Animal Models: A Systematic Review on Toxic Potential," *Tissue Eng. Part B Rev.*, **17**(1), 57-69 (2011).
6. Kayat, j., Gajbhiye, V., Tekade, R. K., and Jain, N. K., "Pulmonary Toxicity of Carbon Nanotubes: A Systematic Report," *Nanomedicine*, **7**(1), 40-49 (2011).
7. Mutlu, G. M., Budinger, G. R., Green, A. A., Urich, D., Soberanes, S., Chiarella, S. E., Alheid, G. F., McCrimmon, D. R., Szleifer, I., and Hersam, M. C., "Biocompatible Nanoscale Dispersion of Single-walled Carbon Nanotubes Minimizes in Vivo Pulmonary Toxicity," *Nano Lett.*, **10**(5), 1664-1670 (2010).
8. Johnston, H. J., Hutchison, G. R., Christensen, F. M., Peters, S., Hankin, S., Aschberger, K., and Stone, V., "A Critical Review of the Biological Mechanisms Underlying the in Vivo and in Vitro Toxicity of Carbon Nanotubes: The Contribution of Physico-chemical Characteristics," *Nanotoxicology*, **4**(2), 207-246(2010).
9. Kim, M., Choi, K., Kim, Y., and Yi, J., "Risk Assessment for Health and Environmental Hazards of Nanomaterials," *Clean Technology*, **13**(3), 161-172 (2007).
10. Tabet, L., Bussy, C., Setyan, A., Simon-Deckers, A., Rossi, M. J., Boczkowski, J., and Lanone, S., "Coating Carbon Nanotubes with a Polystyrene-based Polymer Protects Against Pulmonary Toxicity," *Part Fibre Toxicol.*, **8**, 3 (2011).
11. Yamashita, K., Yoshioka, Y., Higashisaka, K., Morishita, Y., Yoshida, T., Fujimura, M., Kayamuro, H., Nabeshi, H., Yamashita, T., Nagano, K., Abe, Y., Kamada, H., Kawai, Y., Mayumi, T., Yoshikawa, T., Itoh, N., Tsunoda, S., and Tsutsumi, Y., "Carbon Nanotubes Elicit DNA Damage and Inflammatory Response Relative to Their Size and Shape," *Inflammation*, **33**(4), 276-280 (2010).
12. Donaldson, K., Murphy, F., Schinwald, A., Duffin, R., and Poland, C.A., "Identifying the Pulmonary Hazard of High Aspect Ratio Nanoparticles to Enable Their Safety-by-design," *Nanomedicine (Lond.)*, **6**(1), 143-156 (2011).
13. Donaldson, K., Murphy, F. A., Duffin, R., and Poland, C. A., "Asbestos, Carbon Nanotubes and the Pleural Mesothelium: A Review of the Hypothesis Regarding the Role of Long Fibre Retention in the Parietal Pleura, Inflammation and Mesothelioma," *Part Fibre Toxicol.*, **7**, 5 (2010).
14. Pacurari, M., Castranova, V., and Vallyathan, V. "Single- and Multi-wall Carbon Nanotubes Versus Asbestos: Are the Carbon Nanotubes a New Health Risk to Humans?," *J. Toxicol. Environ. Health A*, **73**(5), 378-395 (2010).
15. Park, E. J., Cho W. S., Jeong J, Yi, J., Choi, K., and Park, K., "Pro-inflammatory and Potential Allergic Responses Resulting from B Cell Activation in Mice Treated with Multi-walled Carbon Nanotubes by Intratracheal Instillation," *Toxicology*, **259**(3), 113-121 (2009).
16. Park, E. J., Roh, J. Kim, S. N., Kim, Y., Hong, J. T., and Choi, K., "A Single Intratracheal Instillation of Single-walled Carbon Nanotubes Induced Early Lung Fibrosis and Subchronic Tissue Damage in Mice," *Arch. Toxicol.*, **85**(9), 1121-1131 (2011).