

F344 rats를 이용 망간 및 철 화합물의 체내 흡수와 생식기 및 운동성에 미치는 영향

김현영[†] · 이성배 · 한정희 · 최성봉 · 강민구 · 이채관¹

산업안전보건연구원 화학물질안전보건센터
¹인제대학교 산업의학연구소 및 부산백병원 산업의학과

Effect of Mn and Fe Compound on the Absorption in the Body and Genital Organs, Activity with F344 Rats

Hyeon-Yeong Kim[†] · Sung-Bae Lee · Jeong-Hee Han · Sung-Bong Choi · Min-Gu Kang · Chae-Kwan Lee¹

*Chemical Safety&Health Center, Occupational Safety&Health Research Institute,
104-8 Munji-dong, Yuseong-gu, Daejeon, Korea*

*¹Institute of Industrial Medicine, Department of Occupational and Environmental Medicine, Busan Paik Hospital, Inje
University*

This study aimed to examine the harmful effects of Mn and Fe, which may be generated as dust or fume in the industrial sites, on the body and genital organs by their inhalation. It is intended to find the characteristics and differences of the hazardousness by inhaling a single and the mixed materials of Mn and Fe. Male F344 rats were divided into the control group and 3 exposed groups on the basis of the test material compound (Mn 1.5 mg/m³, Mn 1.5 and Fe 3.0 mg/m³, Fe 3.0 mg/m³). The 4 groups were divided into 4 subgroups again on the basis of the exposure period (4 and 13 weeks) and the recovery period (4 and 13 weeks). The exposure condition was 6 hours a day, 5 days a week for the whole body.

Clinical tests including changes in weight and feed rate, blood biochemical test, motility change, changes in the number and the amount of spermatozoon (sperm count), daily sperm production (DSP), deformity test of spermatozoon and changes

in the accumulation of Mn and Fe in blood and internal organs were performed.

Motility was reduced by Mn exposure. Especially, the effect of Mn was exposure period responsible. By mixing with Fe, no significant change in motility Mn and Fe accumulation in organs was observed. Sperm count and daily sperm production (DSP) were decreased by Mn. Additional effect like the reduction of sperm count and DSP, and delayed restoration of sperm count and DSP during the recovery period were observed in the mixed exposure group. These results indicate that Mn and Fe may affect the motility reduced and has male reproductive toxicity. Mixed exposure of Mn and Fe lead to synergic effects on the male reproductive toxicity.

Key Words : Mn, Fe, Inhalation Toxicity, Manganese toxicity

I. 서론

우리 인체의 구성 성분은 다양한 물질로 이루어져 있으며 이들 중 Fe, Ca, Zn, Cu, Mn의 성분도 없어서는 안 되는 중요한 물질들로 대부분 음식물로 통해 흡수되고 있다. 이들 중 Fe와 Mn은 생체대사에 필수원소이지만 과량으로 흡수할 경우 Fe는 과산화물의 생성을 증가시켜 DNA손상 등 독성작용(Halliwall & Gutteridge, 1984)을 나타내고, Mn은 중추신경계에 대한 신경독성과 정자의 감소, follicular stimulating hormone(FSH)과 testosterone의 농도가 감소되며, 사람에게 있어서는 성욕 감소 등의 영향을 나타낸다(Donaldson, 1987; Komura, 1992; Ponnappakkam 등, 2003).

산업현장에서 Mn은 분진이나 흙, 미스트 형태로 노출되며, 화합물의 종류, 입경, 노출농도, 개인의 감수성에 따라 호흡 및 신경계의 장애가 나타나고, 고농도 장기간 노출의 경우 만성적 건강장애로 파킨슨증을 일으키는 물질로 알려져 있다(박정일 등, 1991; Nelson 등, 1993). Mn의 만성 노출은 신경학적 이상소견이나 파킨슨증이 발병되며 이러한 질병은 회복이 어려운 특징을 가지고 있어(Calne 등, 1994; Lu 등, 1994) 만성적 중독의 예방을 위해 조기진단법 개발을 위한 노력들이 다양하게 이루어져 왔다(Chandra 등, 1974; Khandelwal 등, 1981; Siqueira 등, 1991; Nelson 등, 1993).

일반적으로 Mn에 의한 중독을 조사하기 위해서는 생물학적 모니터링 방법으로 혈 및 뇨 중의 농도측정을 통해 노출 정도를 확인할 수는 있으나 신경장애 및 파킨슨증을 예측할 수는 없는 한계가 있어 최근에는 신경세포의 손상에 의한 생화학적 예측지수로 혈청내의 adenosine deaminase(ADA)의 활성도 변화, 총 콜레스테롤 및 HDL 콜레스테롤의 측정, 뇌자기공명촬영 소견 등이 활용되고 있으며(Mirowitz 등, 1991; Nelson 등, 1993), Mn을 함유한 물질은 신경계를 포함한 내분비계에 영향을 미치는 물질로 알려져 있어 신경독성 및 내분비계 교란물질 연구가 활발히 진행되고 있다(Siqueira 등, 1991; Nelson 등, 1993). 그러나 산업현장 근로자들의 경우 Mn 단일물질에 노출되는 경우 보다는 Fe를 포함한 다양한 혼합물질로 노출된다는 사실을 감안 할 때 이의 생체영향과 원인 규명에 있어 Mn 단일물질과 다른 금속의 혼합물질 노출에 따른 독성학적 차이에 대한 비교연구는 매우 부족하다.

따라서 본 연구에서는 그동안 Mn 중독근로자에서 나타난 신경행동학적 및 생식기능장애에 대한 영향보고(Gray & Laskey, 1980; Roels 등, 1987; Calne 등, 1994; Lu 등, 1994; Ponnappakkam, 2003)를 토대로 실험동물인 F344 rat를 이용 Mn과 Fe의 흡입노출에 따른 영향을 규명하고자 하였으며, 이를 위해 흡입 챔버와 분진발생기를 이용 호흡성분진 크기(1 μ m 수준) 형태로 실험동물에 13주간 전신 흡입 노출시킨 후 시

험물질별, 노출기간별 각 시험 군에 대한 혈액과 정소, 폐장, 간장, 뇌를 중심으로 금속성분의 체내 축적량을 조사하고, 실험동물의 체중 및 혈액생화학적 변화, 정소를 이용한 정자수와 생산량, 기형성 검사, 운동성의 변화 등을 조사하여 Mn과 Fe의 흡입 노출시 실험동물의 생체에 나타나는 변화를 토대로 사람에게 미치는 영향을 예측하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시험물질

시험물질은 Mn 및 Fe의 흡입노출에 의한 체내흡수량, 생체의 운동성 변화, 생식기에 미치는 영향 등의 연구를 목적으로 실험동물을 이용 실험실적 연구를 위해 Mn 및 Fe화합물인 MnSO₄와 FeSO₄를 분진형태로 노출시켰다.

시험물질은 MnSO₄와 FeSO₄를 Sigma Aldrich (USA)에서 구입한 1급 (MnSO₄ · H₂O, 제조번호, 035K0248; FeSO₄ · 7H₂O, 제조번호, 025K0574) 시약을 사용하였으며, 산업현장에서 근로자의 Mn 및 Fe 분진의 노출상황을 고려 호흡성 분진크기로 노출하기 위해 증류수에 용해한 후 분진발생장치(SIBATA Co., Japan)를 이용 이를 분사하여 공기 중에서 순간 건조 미세분진 형태로 변화시켜(평균입자 크기: 1 μ m) 실험동물에 노출시켰다. 대조물질은 HEPA filter를 이용 정화된 청정공기를 사용하였다.

2. 실험동물 및 사육환경

본 연구에 사용된 실험동물은 미생물 또는 세균에 의한 감염병원체 등 특정병원체 부재(specific pathogen free, SPF) 동물이며 임상 및 혈액학적 기초 자료가 풍부하여 일반 독성시험에서 많이 사용되는 F344 rat를 실험동물로 선택하였다. 실험동물은 6주령의 수컷 rat 85마리를 중앙실험동물(주)에서 구입하여 검역 및 1주일간 순화 후 건강한 동물 80마리를 시험 군별 체중 편차가 최소화 되도록 분리하여 5연식 스테인레스 철망케이지에 개체별로 수용하였으며, 청정사육시설(barrier system)에 설치된 4대의 흡입 챔버(inhalation chamber)와 분진발생 장치 및 모니터링 장비를 이용 실험동물에 시험물질을 노출시켰다. 노출군의 영향 평가는 대조군을 기준으로 유의성을 평가하였으며, 유의성이 있으나 실험동물의 기초 자료를 토대로 정상범위(강진석 등, 2001) 내에 들어가는 경우는 유해성영향으로 판단하지 않았다.

시험기간 중 사육환경은 온도 21-24 °C, 상대습도 40-60 %, 조명 150~300 Lux로 12시간 점등 및 소등 하였고, 사료는 실

험동물용 멸균사료 LabDiet 5002(PMI Nutrition, USA)를, 식수는 상수도수를 삼투압정수 및 자외선 멸균 처리한 음용수를 자유롭게 섭취토록 하였다. 단, 시험물질 노출 중에는 사료를 공급하지 않았다.

3. 시험농도 및 군분리

시험농도 설정은 작업환경 노출기준(노동부, 2002) 및 다른 연구자들의 연구자료(유일재 등, 2003; Ponnappakkam, 2003)를 토대로 rat에 13주간 흡입노출시 영향농도로 나타날 수 있는 예측농도로 설정하였으며, 시험군은 대조군, Mn 및 Fe의 단일 및 혼합물질 노출군으로 분리하고 노출기간(4주, 13주) 및 회복기간(4주, 13주)의 단계적 검사를 하였다.

따라서 실험동물인 rat를 대조군(0 mg/m³)과 Mn노출군(Mn 1.5 mg/m³), 혼합물질 노출군(Mn 1.5 mg/m³ + Fe 3.0 mg/m³) 및 Fe 노출군(Fe 3.0 mg/m³)의 4군으로 나누었고, 실험군당 동물 수는 수컷 각 20마리(합계 80마리)로 하여 시험물질 노출 4주, 13주 그리고 노출 중단 후(회복기간) 4주, 13주 후에 각 군별 각 5마리씩에 대해 각 시험항목별 검사하였다.

4. 시험물질 노출 및 모니터링

시험물질은 전신노출을 통한 흡입 및 피부흡수로 하여, 내부용적 1 m³의 흡입챔버 및 분진발생장치를 이용 1일 6시간, 주 5일, 4주 및 13주간 노출하고, 그 후 4주 및 13주간 회복기간으로 구분하였으며 시험시간 중 흡입 챔버 내 온도, 습도, 압력, 환기량은 환경모니터링장치(Model No. ICS-20RG, SIBATA Co., LTD, Japan)를 이용 30분 간격으로 측정하였다.

5. 혈액 및 장기조직 내 금속의 축적성

13주간 시험물질 노출 완료 후 부검하여 혈액과 정소, 뇌, 폐장, 간장의 일정량(0.5 g 정도)을 취하여 초음파회화기에서 69% 질산으로 전처리 한 후 원자흡광광도계(Perkin Elmer AAnalyst 600, German)를 이용 혈액과 각 장기에 흡수된 중금속(Mn, Fe)의 농도를 분석하였다.

6. 실험동물의 임상증상 및 체중변화

Rat의 검역 및 순화기간은 매일 1회, 노출기간에는 노출 전후 2회 생사 유무, 외모, 운동성, 출혈, 호흡이상 등을 관찰하였고 체중은 입수일, 군 분리일, 투여개시일 및 투여 후 7일까지는 매일, 그리고 7일 이후에는 주 1회 측정하였다.

7. 혈액 검사

시험물질 노출 및 회복기간에 따라 각 군별, 시험기간별 해당 실험동물에 대해 복대 동맥에서 혈액을 채취 hemoglobin(HGB), hematocrit(HCT), mean corpuscular volume(MCV) 등을 혈구계수기(Hemacyte, Oxford Science. Inc, USA)를 이용하여 분석하였고, 혈액생화학분석기(TBA 20FR, Japan)를 이용 total protein(TP), albumin(ALB), urea nitrogen in blood(BUN) 등을 분석하였다.

8. 생식기에 미치는 영향 검사

(1) 정자수 및 일일 정자생산량 검사

각 시험물질 군별, 시험물질 노출기간별 실험동물을 부검하여 적출한 고환(testis)의 무게를 측정 한 뒤 외막을 절개하고 내용물에 20 ml의 0.1% Triton X-100이 포함된 0.9% saline 용액을 가한 후 polytron homogenizer로 2분간 homogenization 하고 4 °C에서 3분간 초음파 처리하였다.

그 후 10 μl의 현탁액을 hemacytometer에 떨어뜨린 후 현미경(X 200)으로 homogenization-resistant 정자(sperm)와 정아세포(spermatid)의 수를 조사하였다. 일일 정자생산량은 조사된 정자와 정아세포의 수를 rat의 정자발달단계 중 homogenization-resistant 정자와 정아세포가 관찰되는 6.1일로 나누어 계산하였다(Robb 등, 1978; Blazak 등, 1993).

(2) 정자의 기형검사

0.1% Triton X-100이 포함된 0.9% saline용액으로 정관에서 성숙된 정자를 추출 한 후 적정배율(약 50-100 배) 희석하여 광학현미경(X 200)을 이용 정자의 머리 기형(Cephalic dysplasia: Two head, small head)과 꼬리의 기형(Bent tail, cytoplasmic budding)을 조사하였다.

9. 운동성 변화 검사

각 군별 시험물질 노출 4주 및 13주, 그리고 노출 중단 회복 4주 및 13주 실험동물에 대해 적외선 감시센서가 부착된 운동성 측정 장치(Activity monitoring system, Sibata, Japan)를 이용 운동성의 변화를 측정하였다.

10. 통계처리

각 검사 항목별 실험동물 수는 5마리이며 시험결과의 통계

III. 결 과

처리는 평균과 표준편차로 표기하고 동물의 체중, 장기별 무게 등은 Paired-Sample t-test를 이용 5%(p<0.05)의 신뢰한계로 검정하고 최종으로는 1%(p<0.01), 0.1%(p<0.001)의 신뢰한계로서 대조군과 노출군의 유의성을 확인하였다. 혈액검사는 sigmastat의 일원배치분산분석(One-way ANOVA)을 하였으며 유의성이 인정된 자료는 Dunnett 다중비교법을 이용 5% 수준에서 유의차 검정을 하였다.

1. 시험물질 노출농도 모니터링

시험물질 노출 기간동안 흡입챔버 내 각 군별 시험물질 노출농도를 측정된 결과는 Table 1과 같다. 노출농도는 Mn은 1.58-1.70 mg/m³이었고 Fe는 2.75-2.79 mg/m³이었으며, 실험동물에 노출된 시험물질 입자의 크기는 Figure 1과 같이 평균 1.26-1.51 μm이었다.

Table 1. Exposure concentration of Mn and Fe among the experimental groups in the inhalation chamber

Group	Exposure concentration (mg/m ³)				
	Establishment	Upper	Lower	N ¹⁾	Mean ± SD
Control	0	0.00	0.00	0.00	00.00 ± 0.00
Mn group	Mn	3.09	0.25	0.25	1.70 ± 0.55
Mn + Fe group	Mn	2.52	0.32	0.32	1.58 ± 0.60
	Fe	5.77	0.41	0.41	2.75 ± 1.29
Fe group	Fe	4.98	0.58	0.58	2.79 ± 0.98

N¹⁾: Number of samples

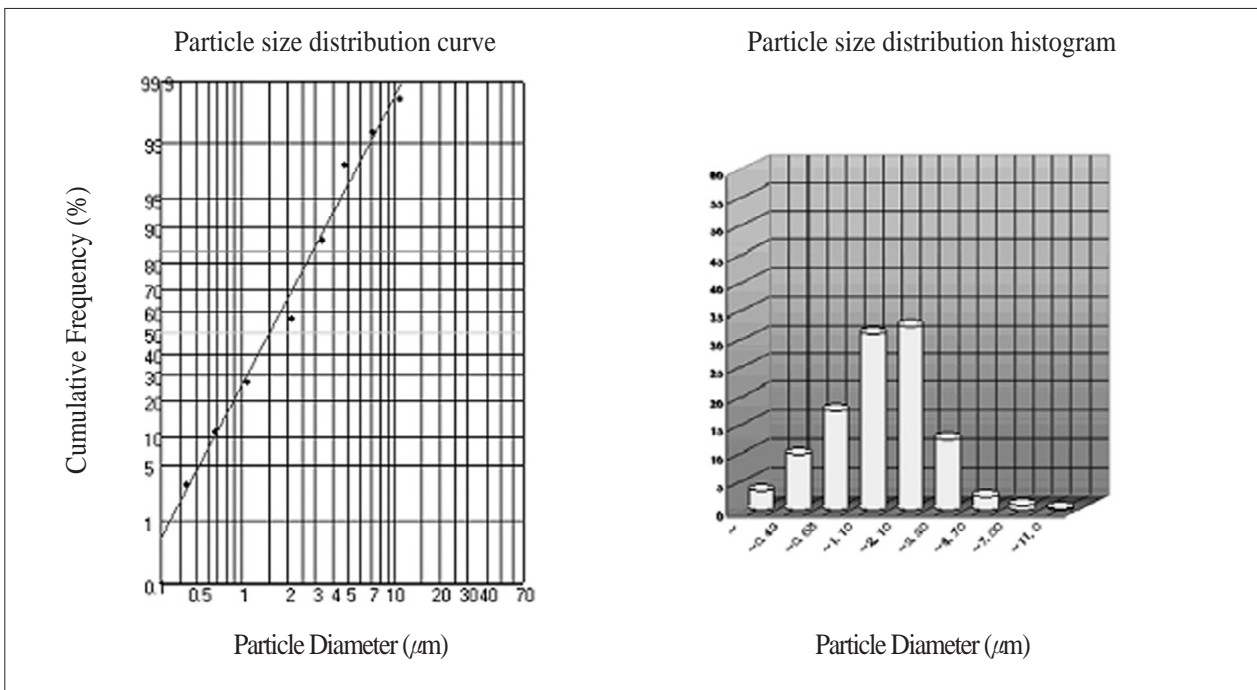


Figure 1. Particle size distribution analysis & histogram of exposure mist compound (Mn and Fe)

2. 혈액 및 장기 조직 내 금속의 축적성

(1) 혈액 중 금속의 축적성

시험물질 노출 4주 및 13주와 회복 4주 및 13주 실험동물에 대해 부검시 혈액을 채취, 혈액 내 중금속의 함량을 분석하였으며 그 결과를 Table 2에 나타내었다. Mn군의 경우 노출 4주 및 13주와 회복 4주에서 대조군에 비해 유의성($p < 0.01$, $p < 0.001$) 있는 증가를 보였으며, 혼합물질의 경우 노출 후 4주 회복군에서 Mn의 함량이 유의성($p < 0.01$) 있는 증가 현상을 보였다. 그러나 회복 13주 후에는 혈액 내 Mn과 Fe의 함량이 모두 낮아져 대조군과 유사한 수준으로 회복되었다. 또한 Fe의 경우 시험물질 노출에 따른 혈액 내 Fe증가량은 대조군과 차이가 없었다.

(2) 장기별 금속의 축적성

Rat에 시험물질을 노출한 후 4주와 13주, 그리고 노출 중단 후 4주, 13주 회복군에 대해 정소, 간장, 폐장, 뇌를 적출 장기 내 Mn 및 Fe성분을 분석하여 Figure 2에 나타내었다.

정소의 경우 4주간 노출 Mn 및 혼합물 군에서 Fe의 유의성($p < 0.01$) 있는 감소와 13주간 노출의

Mn 군에서 Mn의 농도가 유의성($p < 0.001$) 있게 증가하였으며, 혼합물 군의 경우 Fe 및 Mn농도가 유의성($p < 0.01$, $p < 0.05$) 있게 증가하였으며 회복기간에는 대조군과 유사한 농도로 회복되었다.

간장의 경우 노출 4주후 혼합물질 군에서는 Fe의 감소경향과 13주 회복기간에는 다시 증가(회복)하는 경향을 보였다.

그러나 Mn의 경우 13주간 노출시 Mn노출에 따른 Mn농도의 증가를 보였으며 혼합물질 군에서는 Fe농도가 유의한($p < 0.05$) 증가로 나타났다.

폐장의 경우 혼합물질과 Fe노출군에서 대조군에 비해 노출기간에 따라 Mn, Fe의 유의한($p < 0.01$, $p < 0.001$) 증가 경향을 나타내었으며 회복기간에는 다시 감소의 경향을 보였다.

뇌의 경우는 13주간 노출시 Fe의 농도가 증가하였으며 통계적 유의성($p < 0.001$, $p < 0.05$)이 있었으며, Mn의 경우 노출기간(4주, 13주)에 따라 증가 경향을 보이다 13주 회복기간에는 Mn, Fe 모두 대조군과 유사한 수준으로 회복되었다.

3. 실험동물의 임상증상 및 체중변화

시험물질 노출 및 회복기간 중 실험동물의 사망 유·무와 외모, 호흡, 배설, 활동성 등에 대한 임상증상을 조사한 결과 대조군을 기준으로 시험물질 노출군의 특이적 임상 소견은 없었으며 체중의 변화는 Figure 3과 같이 시험물질 노출에 따른 대조군을 기준으로 노출군의 유의성은 관찰되지 않았다.

4. 혈액 검사

13주간 시험물질 노출군에 대한 혈액학적 검사결과를 각각 Table 3에, 그리고 혈액생화학적 검사결과를 각각 Table 4에 나타내었다. 13주간 노출군의 혈액학적 검사결과 대조군에 비해 Mn, Fe 및 혼합물질 노출군에서 혈소판이 통계적으로 유의하게($p < 0.01$, $P < 0.001$) 증가되었고, MPV는 Mn노출군에서 통계적으로 유의하게($p < 0.05$) 감소되었다.

또한 혈액생화학적 검사에서는 Table 4에서와 같이 13주간

Table 2. Mn and Fe concentration in blood of F344 rats exposure to Mn and Fe Compound

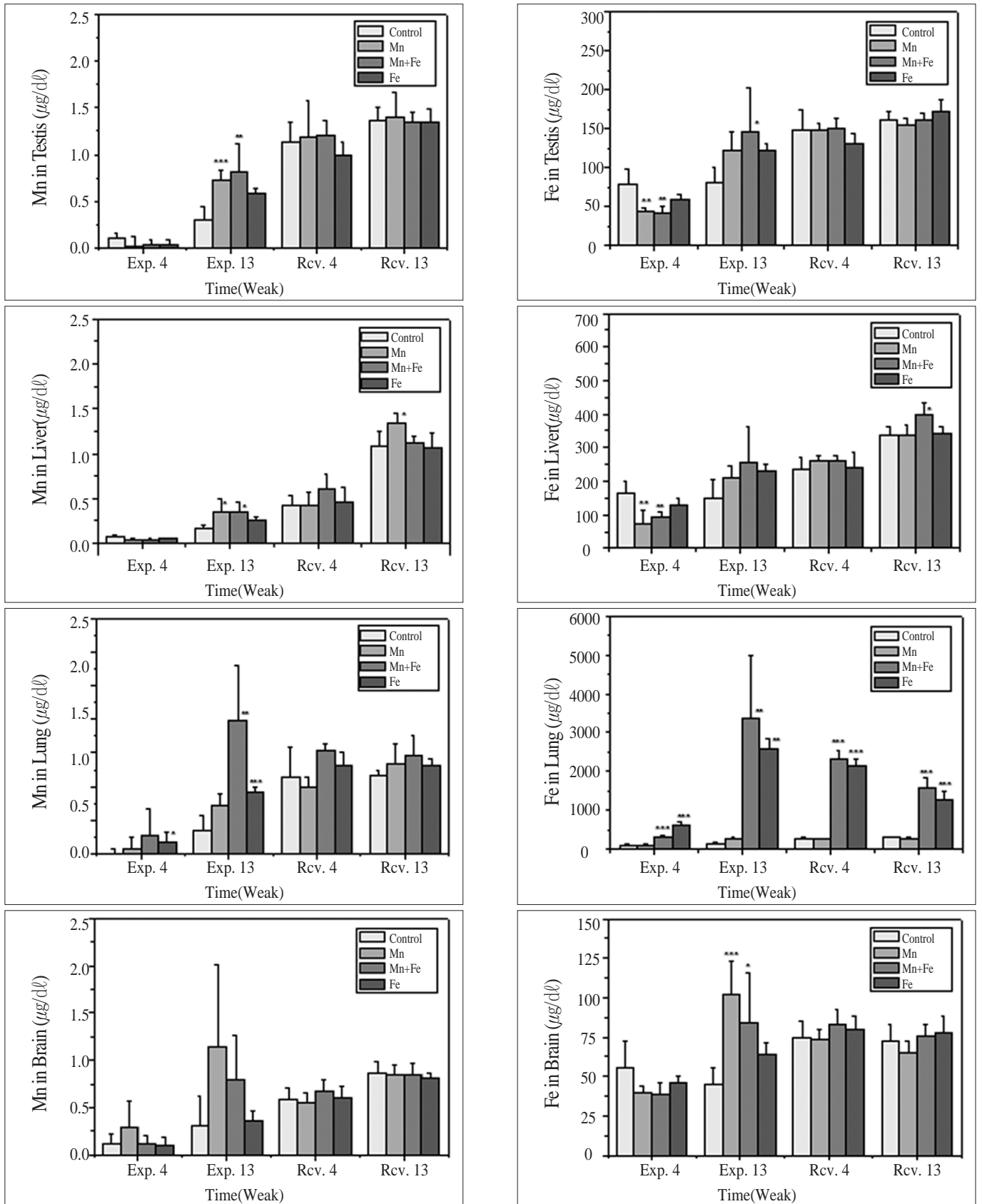
Unit: $\mu\text{g}/\text{dl}$

Group		Control	Mn group	Mn+Fe group	Fe group
Exp.	Mn	0.69 ± 0.03	1.05 ± 0.15***	0.79 ± 0.11	0.60 ± 0.03
	4 week Fe	38.96 ± 2.11	40.16 ± 3.19	36.14 ± 4.70	37.92 ± 3.33
Exp.	Mn	0.92 ± 0.36	1.49 ± 0.13**	1.22 ± 0.13	0.64 ± 0.07
	13 week Fe	39.12 ± 2.55	40.50 ± 3.44	42.07 ± 2.32	39.13 ± 1.95
Rcv.	Mn	0.85 ± 0.09	1.08 ± 0.19**	1.37 ± 0.26**	1.15 ± 0.24
	4 week Fe	36.70 ± 3.87	33.73 ± 4.18	35.38 ± 1.45	35.56 ± 1.40
Rcv.	Mn	0.88 ± 0.30	0.69 ± 0.08	0.68 ± 0.09	0.75 ± 0.09
	13 week Fe	35.45 ± 1.64	35.44 ± 2.10	4.06 ± 3.33	34.49 ± 3.32

Test sample number : 5

All values are expressed as mean ± SD.

Significant differences as compared with control : ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$



Significant differences as compared with control : * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001

Figure 2. Mn and Fe concentration in organs of F344 rats exposure to Mn and Fe Compound

노출군에서 Fe와 혼합물질 노출군에서 TP의 유의성($p < 0.05$) 있는 감소가 관찰되었다. 그러나 이는 정상범위(강진석 등, 2001)내의 수치로 간장, 신장 등 관련 장기검사 결과에서도 이상소견을 나타내지 않아 간장이나 신장질환에 의한 특이적 소견은 아닌 것으로 판단되었다. 그 외에 13주 노출군에서 CRTN과 LDH의 감소, 혈당의 증가가 관찰되었으나 정상범위(강진석 등, 2001) 내에 있어 시험물질 노출에 의한 특이적 병변으로 평가하지 않았다.

5. 생식기에 미치는 영향

(1) 정자수 및 정자 생산량 검사

시험물질 노출에 따른 생식기에 미치는 영향을 조사하기 위해 각 시험 군별 정자 수 및 정자생산량을 조사하였으며 그 결과를 Figure 4에 나타내었다. 시험물질 노출군은 노출기

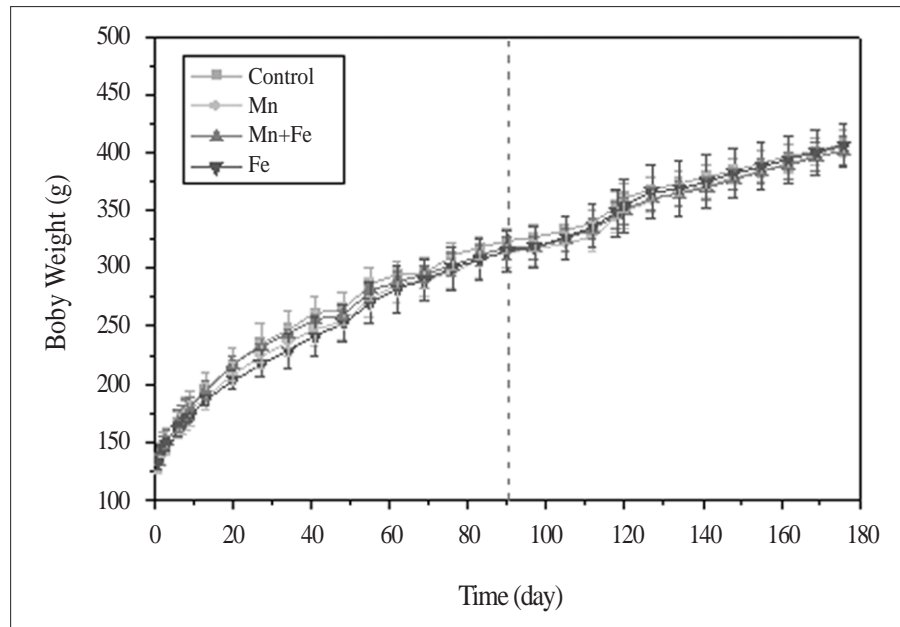


Figure 3. Body weight changes in male F344 rats during of the experimental period

Table 3. Hematological analysis of male F344 rats after Mn and Fe inhalation for 13 weeks

Item	Control	Mn group	Mn+Fe group	Fe group
WBC	2.7±0.71	2.7±0.29	2.7±0.35	2.35±0.46
RBC	5.6±0.32	5.3±0.2	5.62±0.16	5.4±0.24
HGB	14.9±0.59	15.2±0.75	14.5±0.34	14.5±0.69
HCT	25.3±1.70	24.6±0.99	25.9±1.01	24.7±1.29
MCV	45.0±0.69	46.7±0.65*	46.1±0.89	45.8±0.50
MCH	26.6±1.55	28.8±1.32*	25.8±1.01	27.0±1.41
MCHC	59.2±3.66	61.8±2.21	56.0±2.78	58.9±3.20
RDW	15.4±0.24	15.6±0.82	15.1±0.21	15.3±0.19
PLT	1788.8±57.31	2393.6±70.30***	2500.2±133.02***	2087.6±291.24**
MPV	2.4±0.06	2.2±0.06*	2.2±0.11	2.3±0.16

All values are expressed as mean ± SD.

Significant differences as compared with control : * P<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

WBC, white blood cell count (103/mm³); RBC, red blood cell count (106/mm³); HGB hemoglobin (g/dl); HCT, hematocit (%); MCV, mean corpuscular volume (μ³); MCH, mean corpuscular hemoglobin (pg); MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration (%); RDW, red cell distribution with (%); PLT, platelet (103///μ³); MPV; mean platelet volume (fl)

간에 따라 대조군에 비해 정자수가 감소되었으며 특히 혼합 물질 노출군이 가장 많이 감소되었다. 13주간 노출 후 회복 4 주부터는 노출군의 정자수가 점차 증가 되었으며 13주에는 Mn과 Fe 노출군 모두 대조군과 유사한 수준으로 회복되었다. 그러나 혼합물질 노출군의 경우 단일물질 노출군에 비해 정자수의 회복이 느린 경향이 있었으나 변화의 통계적 유의성은 관찰되지 않았다.

(2) 정자의 기형검사

부정소의 정자를 추출한 후 기형정자의 수를 조사한 결과 대조군을 기준으로 노출물질 및 노출기간에 따른 특이적인 정자의 기형 빈도 및 유의차는 없었다.

Table 4. Biochemical analysis of male F344 rats after Mn and Fe inhalation for 13 weeks

Item	Control	Mn group	Mn+Fe group	Fe group
TP	7.1±0.24	6.8±0.11*	6.8±0.05*	6.8±0.11*
ALB	4.6±0.11	4.4±0.12	4.4±0.07	4.4±0.10
BUN	17.3±0.91	15.1±2.36	17.1±2.18	17.8±1.14
CRTN	0.7±0.05	0.6±0.06*	0.7±0.05	0.6±0.05*
T-BIL	01.±0.00	0.1±0.5	0.1±0.00	0.0±0.00
ALT	66.2±16.45	53.8±5.07	61.2±9.31	63.2±6.98
AST	99.2±13.29	93.0±10.39	99.4±11.93	91.6±13.00
LDH	1018.8±341.73	1048.0±219.56	998.6±359.85	469.6±295.20*
ALP	860.4±46.82	707.4±105.85	696.4±110.11	729.2±126.68
Glucose	138.6±11.06	140.6±8.68	155.6±11.31*	157.8±6.26*
T-CHO	72.6±4.83	68.6±1.95	67.6±3.36	67.8±2.95

All values are expressed as mean ± SD.

Significant differences as compared with control : *P<0.05

TP, total protein (g/dl); ALB, Albumin (g/dl); BUN, urea nitrogen in blood (mg/dl); CRTN, Creatinine (mg/dl); T- BIL, total bilirubin (mg/dl); ALT, alanine aminotransferase (u/L); AST, aspartate aminotransferase (u/L); LDH, lactate dehydrogenase (u/L); ALP, alkaline phosphatase (u/L); glucose (mg/dl); T-CHO, total cholesterol (mmol/L).

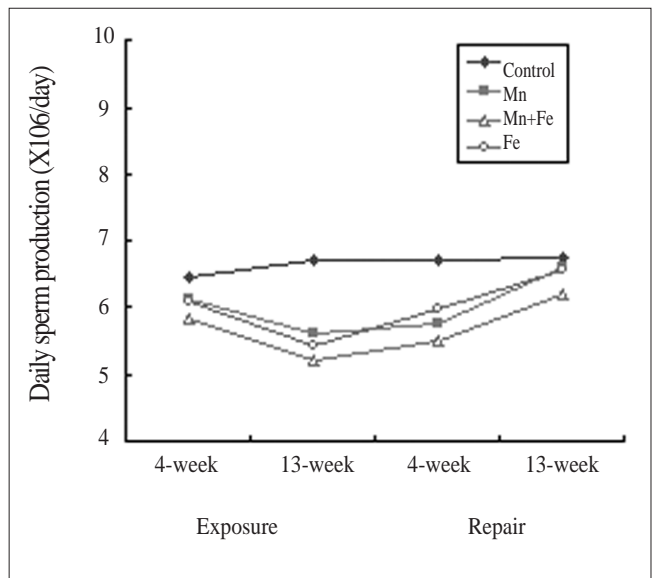
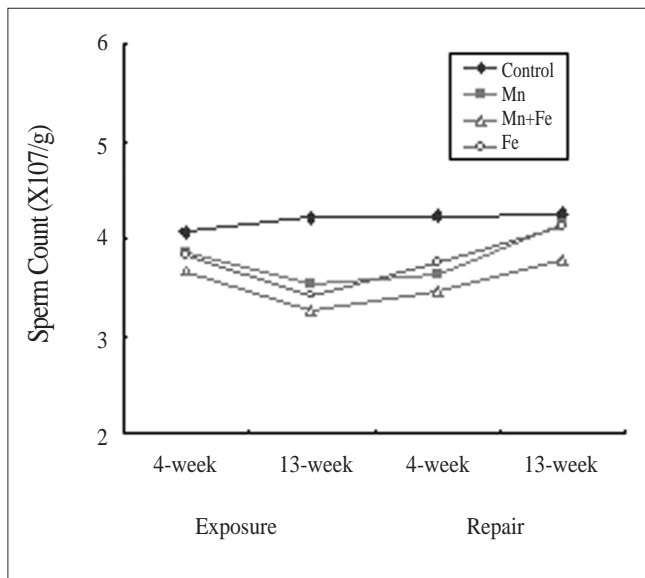


Figure 4. Comparison of sperm count and daily sperm production among the experimental groups.

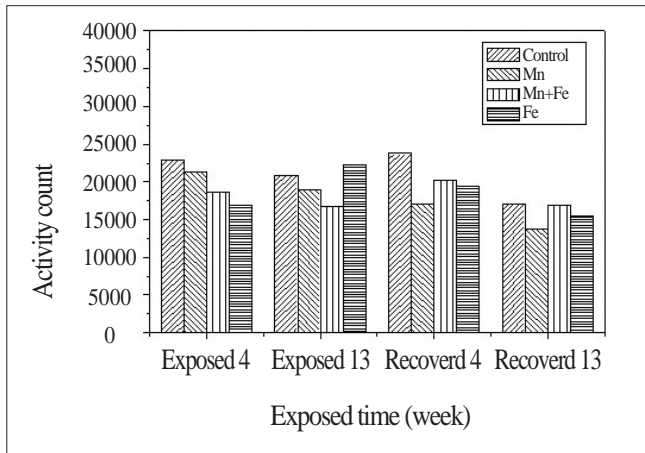


Figure 5. Value of the F344 male rats activity by time changes

6. 운동성의 변화

시험물질 노출 종료 7일전부터 노출 종료일까지(단, 시험물질 노출시간 제외) 대조군과 Mn, Fe, 혼합물질 등 4종의 노출군과 노출기간별 4군(4주와 13주 노출군, 4주와 13주 회복군)의 실험동물에 대해 적외선 감지기를 이용 시험물질 노출 시간에 따른 실험동물의 활동성을 측정하고 그 결과를 Figure 5에 나타내었다. 결과 대조군에 비해 Fe, Mn의 각 시험물질 노출군 실험동물의 활동성이 감소되는 경향을 보였으며, 특히 Mn 노출군은 시험물질 노출기간에 비례하는 노출기간(4주 및 13주) 의존적인 활동성의 감소 경향을 보였다.

IV. 고찰 및 결론

Mn은 분자량 54.94, 비중 7.2, 녹는점 1,244 °C, 끓는점 1,962-2,095 °C의 회백색 금속으로 합금을 통한 철(Fe)의 강도를 높이는 보강제, 탈유황제로 가장 많이 사용되며 그 외 용접봉 피복제, 건전지, 화약, 화학약품, 비료, 사료 보충제 등의 원료로 사용된다. 2004년도 국내 사용량은 22,504톤, 취급사업장은 462개소, 취급 근로자수는 2,937명으로 조사(노동부, 2004; 한국산업안전공단, 2006)되었으며, Mn에 의한 중독 영향으로는 크게 중추신경계와 호흡기장애, 생식장애로 구분되며 1837년 Couper가 최초로 보고한 이래 세계적으로는 1940년까지 353례(Fairhall & Neal, 1943), 이후 1968년까지 118례가 보고(Hunter, 1994)되었으나 그 후 점차 줄어 최근 20 여년에 걸쳐서는 수례에 불과하다(김재우 등, 1998). 또한 국내에서는 1989년 용접봉 재료를 생산하는 Mn분체업체에서 3명의 중독자와 1997년 금속조립 및 용접공에서 발생한 2명의 파킨슨

병 및 신경장해 사례, 1998년 용접공 3명의 신경장해, 2000년과 2002년에는 용접공과 도장공의 근이 긴장증 및 파킨슨증 후군에 대한 자료(김재우 등, 1998; 유일재 등, 2003) 등이 있다.

2007년도 현재 Mn의 노출기준을 보면 우리나라(노동부, 2007)의 경우 망간(흡) 1.0 mg/m³, 망간 및 무기화합물 1.0 mg/m³이며, 미국 ACGIH에서는 0.2 mg/m³, 일본 후생노동성은 관리농도로 하여 1 mg/m³이다. 이는 5.0 mg/m³의 초기기준에서 점차 강화되어 왔으며 이와 관련된 각종 연구결과들을 보면 2-5 mg/m³에서도 중추신경계의 장애가 발생할 수 있다는 보고(Whitlock 등, 1966; Smyth 등, 1973; WHO, 1981)와 1 mg/m³의 노출에서 신경행동학적 및 호흡기의 이상증상과, 0.25-1.6 mg/m³의 수준에서 신경계의 이상증상에 관한보고(Roels 등, 1987)가 있었으며, Lauwerys 등(1985)의 생식력에 관한 연구에서도 약 1 mg/m³의 Mn 노출 환경에서 남성의 생식력이 억제된다는 연구 등이 있다. 그러나 Mn의 발암성연구 관련으로 National Toxicology Program (NTP, 1993)에서 mouse를 이용한 경구투여 발암성시험(2년간) 결과에서는 암 발생율의 양-반응 관계의 의존성은 없는 물질로 확인되었다.

따라서 본 연구에서는 Mn과 Fe의 체내흡수에 따른 각 장기별 금속의 축적성과 운동성의 변화, 생식기에 미치는 관련성 등을 rat를 이용 실험실적 규명을 위해 Mn과 Fe의 시험물질을 분진발생장치를 이용 실험동물의 호흡기 및 폐내 침착이 용이한 입자크기(1 μm수준)로 전신반복 노출시켰다. 시험에 사용된 실험동물은 미생물 또는 세균에 의한 특정병원체 부재동물로 혈액 및 혈액생화학적 기초자료 등이 풍부한 SPF의 F344 rat를 사용하였으며 노출시간은 산업현장의 근로시간을 고려 일일 6시간(휴식시간 고려) 주 5일로 설정하였다.

즉, F344 rat에 Mn 1.58-1.70 mg/m³, Fe 2.75-2.79 mg/m³의 농도로 단일 또는 혼합물질로 하여 1일 6시간, 주 5일, 13주간 시험물질의 반복노출과 13주간 회복기간을 통해 실험동물의 혈액, 정소, 간장, 폐장, 뇌 등 각 장기별 금속의 축적농도를 검사한 결과 Table 2에서와 같이 혈액에서는 Mn의 노출기간에 따라 Mn의 농도는 유의성(p<0.01, p<0.001)있게 증가되었으나 Fe 농도는 변화가 없었으며, 정소의 경우 노출기간 중 Mn, Fe의 농도 증가와 혼합물에 의한 증가작용이 있었으며, 간장의 경우 혼합물 또는 노출기간에 따른 증가작용은 없었다. 단, 폐장의 경우 Mn에 비해 Fe의 양이 통계적으로 유의한(p<0.001) 증가와 혼합물에 따른 Mn 및 Fe의 농도 증가효과가 크게 나타났으며 뇌의 경우 Mn의 농도는 노출기간에 따라 축적량의 증가 경향을 보였으며 이는 신경장해의 영향과 관련성이 있는 것으로 판단되었다.

혈액학적검사결과에서는 Mn과 Fe 및 혼합물질투여군에

서 관찰된 혈소판 수의 증가는 Mn이나 Fe 중독과 관련되는 특이적인 혈액 및 혈청생화학적 영향과 장기중량의 변화가 인정되지 않아 독성학적으로는 의미 없는 변화로 판단되었으며, 혈액생화학적 검사에서 유의성($p < 0.05$) 있는 혈청 단백질의 감소는 주로 동물의 영양부족이나 만성감염증, 간경화, 신증후군, 만성염증 등에 의한 것으로 판단되었다. 또한 Mn과 Fe 및 혼합물질투여군에서 관찰된 TP, ALB, T-CHO의 감소경향을 나타내었으나 유의성은 없었으며 F344 rat의 혈액학적 정상범위(강진석 등, 2001) 내에 있었으며 다른 혈청생화학적 수치로 보아 간장이나 신장질환에 의한 소견은 아닌 것으로 판단되었다. 그리고 대조군을 기준으로 일부 관찰된 CRTN과 젖산탈수소효소의 감소, 혈당의 증가는 정상범위(강진석 등, 2001)내의 수치로 특이적 이상소견으로 판단하지 않았다.

시험물질 노출에 따른 생식기에 미치는 영향조사 관련하여 실험동물의 정소를 이용한 정자수 검사에서는 Figure 4에서와 같이 Mn 및 Fe 노출군은 시험물질 노출기간에 따라 대조군에 비해 정자수가 감소되었으며 13주간 노출 후 회복 4주부터는 노출군의 정자수가 점차 증가되었고 회복 13주에는 Mn과 Fe 노출군은 대조군과 유사하였다. 그러나 혼합물질 노출군의 경우 단일물질 노출군에 비해 정자수 증가의 회복 경향이 느렸으나 통계적 유의성은 관찰되지 않았으며, 정자수의 감소에 있어서도 확연한 유의성은 없었으나 증가작용의 경향은 Gray와 Laskey(1980)와 Ponnappakkam(2003) 등의 mouse를 이용한 구강투여에 의한 연구 결과와 유사한 현상을 보였다.

이와 함께 흡입노출방법은 아니나 다른 연구자들의 Mn에 의한 생식독성 관련성 연구에서도 실험동물에서의 생식기 성숙지연과 고환무게의 감소, 정자형성에 대한 영향 보고(Joardar & Sharma, 1990), Mn을 제조하는 공정에 근무하는 근로자의 자녀수가 대조군에 비해 유의하게 적게 나타났음이 보고(Lauwerys 등, 1985) 등도 있다. 또한 Fe에 대한 연구에서도 rat의 생식기능에 미치는 효과를 보고한 Lucesoli 등(1999)의 연구결과에서는 1,000 mg/kg B.W의 경구투여에서 정자수가 현저히 감소되었으며, Mn의 경우 Gray와 Laskey(1980)의 연구에서도 3,500 ppm 고농도 투여군에서 고환의 무게와 정자수가 감소되었으며, Ponnappakkam 등(2003)은 mouse를 이용 7.5, 15.0, 30.0 mg/kg/day의 Mn을 구강 투여시 정자의 운동성과 정자의 수가 현저히 감소되었다고 보고했다. 본 연구에서도 시험물질 노출에 따른 정자수의 변화를 검사한 결과 Fe와 Mn의 혼합 노출의 경우 정자수 감소에 가중 효과를 나타내었으며, 회복에도 영향을 미치는 것으로 나타났다. 즉, 단일 물질에 비해 Fe가 혼합된 Mn의 경우 생식독성 영향에서 독성의 상승효과를 확인할 수 있었으며, 이는 산업현장의 중금

속 취급 근로자들의 노출 실태가 단일물질 노출 보다는 혼합 물질에 의한 노출환경이 많은 현실을 감안하여 Mn와 Fe 등의 혼합물질 취급 근로자들에 대한 노출 영향 평가에서 고려되어야 하는 주요 근거 자료로 판단되었다.

Mn흡입 노출에 의한 신경독성의 영향 관련성 규명으로 Mn의 전신반복 노출에 따른 실험동물의 운동성변화를 시험한 결과 Figure 5에서와 같이 대조군에 비해 Mn, Fe노출군의 활동성이 감소되는 경향을 보였으며, 특히 Mn 노출군은 시험물질 노출기간에 따른 의존적으로 활동성 감소 경향을 보여 Mn의 흡입노출에 따른 실험동물의 중추신경계 영향을 통한 운동성에 미치는 관련성으로 판단되었다. 그러나 단일 물질에 비해 혼합물질의 노출에 따른 운동량 감소 등 특이적 영향은 관찰되지 않았다. 따라서 본 동물실험결과는 사람에게 있어서 Mn의 장기노출시 파킨슨증 등 신경행동학적 변화의 증독증상의 연구결과(Roels 등, 1987; Calne 등, 1994; Lu 등, 1994)와 유사한 경향을 보여 향후 유해물질의 노출에 의한 신경행동학적 영향 예측에 실험동물을 이용한 운동성 변화 검사는 매우 유용한 시험법으로 평가되었다.

따라서 이러한 연구결과를 토대로 F344 rat에 Mn 1.58-1.70 mg/m³, Fe 2.75-2.79 mg/m³의 농도로 1일 6시간, 주 5일, 4주 및 13주 반복노출과 4주 및 13주간 회복시험에서 Mn 노출군의 뇌와 정소에서의 Mn농도 증가와 폐장의 Mn 및 Fe증가, 혈액생화학적 변화, Mn노출군에서 정소의 정자수 감소, Mn 노출군의 운동성 저하 등의 유해성 영향이 확인되었으며 이를 토대로 실험동물에 의한 Mn의 흡입독성연구에서 무유해영향농도(NOAEL)는 1.5 mg/m³이하로 평가되어졌다.

또한 본 연구에서는 시험기간 및 시험설비의 한계성이 있으나 향후 저농도(1 mg/m³ 수준) 장기노출(1년 이상)에 의한 만성독성시험이나 신경독성, 생식독성시험 등의 다양한 시험방법과 실험군(실험동물의 수, 노출농도, 노출기간)을 증가시킬 경우 운동성 및 생식기에 미치는 영향을 포함 시험물질이 생체에 미치는 영향들을 더욱 명확히 확인할 수 있을 것으로 사료된다.

REFERENCES

- 강진석, 남기택, 박인승, 안병우, 양기화 등. 독성병리학 도감. 청구문화사; 2001;80-81
- 김재우, 김양호, 정해관, 이애영 등. 망간중독에 의한 파킨슨 증후군 3례 -파킨슨병과의 감별점을 중심으로-. 대한신경과학회지 1998;35:336-340
- 노동부. 전국 제조업체 작업환경 실태조사. 2004.
- 노동부. 노동부고시 제2007-25호. 화학물질 및 물리적인자의

- 노출기준. 2007
- 박정일, 노영만, 구정완, 이승한. 원광분쇄작업장에서 망간 폭로. *대한산업의학회지*, 1991;3:111-118
- 유일재, 박건구, 임경택 등. 용접공 진폐 진단을 위한 DNA chip 개발연구 보고서. 한국산업안전공단. 2003
- 한국산업안전공단. 물질안전보건자료(MSDS), 안전보건정보서비스 (KOSHA NET), <http://www.kosha.net/shdb/msds/main.jsp>. 2006.
- Blazak, W.F., Treinen, K.A. and Juniewicz, P.E. Application of testicular sperm head counts in the assessment of male reproductive toxicity. In: Chapin, R.E., Heindel, J.J. (Eds.), *Methods in toxicology*. Academic Press: San Diego; 1993.p.86-105.
- Calne, D.B., Chu, N.S., Huang, C.C., Lu, C.S. and Olano, W. Manganism and Idiopathic Parkinsonism. *Neurology* 1994;44:1583-1586
- Chandra, S.V., Seth, P.K. and Mankeshwar, J.W. Manganese Poisoning. *Clinical and Biochemical Observations. Environ Res* 1974;7:374-380
- Donaldson, J. The physiopathologic significance of manganese in brain: its relation to schizophrenia and neurodegenerative disorders. *Neurotoxicology* 1987;8:451-462
- Fairhall, L.T. and Neal, P.A. Industrial manganese Poisoning, *National Institutes of Health Bull.* 1943.p.182
- Gray, L.E. and Laskey, J.W. Multivariate analysis of the effects of manganese on the reproductive physiology and behavior of the male house mouse. *J. Toxicol. Environ. Health* 1980;6:861-867
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 1984;219:1-14
- Hunter, D. *The Diseases of Occupation*, 8th ed. (P. Reffle, P. Adams, P. Baxter and W. Lee, Eds). Little Brown & Co., Boston.; 1994.
- Joardar, M. and Sharma, A. Comparison of clastogenicity of inorganic Manganese administered in cationic and anionic forms in vivo. *Mutat. Res.* 1990;240:159-163
- Khandelwal, S. and Tandon, S.K. Effect of Manganese Certain Enzymes and Constituents of Blood and Serum in Rabbits. *Environ. Res.* 1981;24:82-88
- Komura, J. and Sakamoto, M. Effects of manganese forms on biogenic amines in the brain and behavioral alterations in the mouse: long-term oral administration of several manganese compounds. *Environmental Research* 1992;57:34-44
- Lauwerys, R., Roels, H., Genet, P. Toussaint, G., Bouckaert, A., and De Cooman, S. Fertility of Male Workers Exposed to Mercury Vapor or Manganese Dust: A Questionnaire Study. *Am. J. Ind. Med.* 1985;7:171-176
- Lucesoli, F., Caligiuri, M., Roberti, M.F., Perazzo, J.C. and Fraga, C.G. Dose-dependent increase of oxidative damage in the testes of rats subjected to acute iron overload. *Arch. Biochem. Biophys.* 1999;372:37-43
- Lu, C.S., Huang, C.C., Chu, N.S. and Calne, D.B. Levodopa Failure in Chronic Manganism. *Neurology* 1994;44:1600-1602
- Mirowitz, S.A., Westrich, T.J. and Hirsch, J.D. Hyperintense Basal Ganglia lesions on T1-Weighted MR Images in Patients Receiving Parenteral Nutrition. *Radiology* 1991;181:117-120
- Nelson, K., Golnick, J., Korn, T. and Angle, C. Manganese Encephalopathy: Utility of Early Magnetic Resonance Imaging. *Br. J. Ind. Med.* 1993;50:510-513
- National Toxicology Program (NTP). Toxicology and carcinogenesis studies of manganese (II) sulfate monohydrate in F344/N rats and B6C3F1 mice (feed study). Technical Report Series 428: RISKLINE 94030007; 1993.
- Ponnappakkam, T.P., Bailey, K.S. Graves KA and Iszard MB. Assessment of male reproductive system in the CD-1 mice following oral manganese exposure. *Reprod. Toxicol.* 2003;17:547-551
- Robb, G.W., Amann, R.P. and Killian G.J. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *J. Reprod. Fert.* 1978;54:103-107
- Roels, H., Lauwerys, R. and Buchet, J.P. Epidemiological Survey Among Workers Exposed to Manganese: Effects on Lung, Central Nervous System, and Some Biological Indices. *Am. J. Ind. Med.* 1987;11:307-327
- Siqueira, M.E.P.B., Hirta, M.H. and Adballa, D.S.P. Studies on Some Biochemical Parameters in Human Manganese Exposure. *Med. Lav.* 1991;82:504-509
- Smyth, L.T., Ruhf, R.C. and Whitman, N.E. Clinical Manganism and Exposure to Manganese in the Production and Processing of Ferromanganese Alloy. *J. Occup. Med.* 1973;15:101-109
- Whitlock, C.M., Amuso, S.J. and Bittenbender, J.B. Chronic neurological disease in two Manganese steel workers. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 1966;27:454-459
- World Health Organization (WHO). Environmental health criteria 17: Manganese, Geneva, Switzerland; 1981.