

◀ 총 설 ▶

담배적용 생체내(*in vivo*) 평가

-아만성 흡입독성 시험을 중심으로-

손 형 옥

KT&G 중앙연구원
(2008년 6월 2일 접수)

In Vivo Toxicological Assessment of Tobacco Products : *Subchronic Inhalation Toxicity*

Hyung Ok Sohn*

KT&G Central Research Institute
(Received June 2, 2008)

1. 서 론

인체 시험 결과가 없을 경우 독성을 평가할 수 있는 가장 좋은 방법은 실험동물을 이용하여 화학 물질들의 독성을 구명하는 것이다 (SOT, 1999). 최근 연구용으로 실험동물을 사용하는 것에 대해 윤리적 책임이 제기되어 생체 내 시험들을 대체할 수 있는 생체 외 시험들이 개발되고 있다. 그러나 생물학적으로 활성이 있는 복잡한 혼합물의 생체 내 대사를 이해하고 인체 독성 및 질환의 발현을 예측할 수 있는 가장 좋은 시험방법은 생체 내 독성평가법이다.

흡연이 호흡기 질환 등 몇몇 질환과 상관성이 있다는 역학조사의 발표 이후 실험동물에서 이를 재현하려는 많은 시도들이 이루어졌다. 독성학자들 간에도 담배연기 노출과 영향의 복잡성을 설명할 수 있는 완전한 시험법 및 결과해석에 대한 의견이 일치하지는 않는다. 그럼에도 불구하고 담배연기의 독성을 이해할 수 있는 더 좋은 방법이 개발될 때까지는 다양한 노출경로를 통한 실험동물

을 이용한 생체 내 시험이 계속되어야 할 것이다.

담배를 적용한 생체 내 평가법으로는 14일 흡입 독성시험, 90일 (13주) 흡입독성 시험 (아만성 흡입독성 시험) 및 피부도말 중앙발생 시험 등이 있다. 14일 흡입독성시험은 13주 흡입독성 시험을 위한 용량 결정의 단계로서 목표 조직(target tissue) 및 독성을 확인할 수 있는 근거를 제공한다. 90일 흡입독성 시험은 담배의 일반적인 독성 정보를 제공하며 광범위한 시험 실적들이 있다 (Gaworski 등, 1998; Terpstra 등, 2003; Yoshimura 등, 2006). 피부 도말 중앙 발생 시험은 TPM을 SENCAR 생쥐의 피부에 도포한 후 종양생성이 촉진되는 지를 조사한다 (Gaworski 등, 1999). 이 외에도 위험감소제품 평가에 필수적인 흡연 관련 질환 (만성폐쇄성 폐질환, 폐암, 심혈관 질환) 평가법이 있다. 이 장에서는 생체 내 독성평가법의 핵심 기술에 해당되는 아만성 흡입독성 평가법을 중심으로 기술하였으며 이해를 돕기 위해 첨가물 평가의 예를 들어 설명하였다.

*연락처 : 305-805 대전광역시 유성구 신성동 302 번지, KT&G 중앙연구원

*Corresponding author : KT&G Central Research Institute, 302 Shinseong-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-805, Korea (phone: 82-42-866-5599; fax: 82-42-861-1949; e-mail: hosohnktng@ktng.com)

2. 생체 내 독성평가의 목적 및 활용

담배연기의 생체 내 독성 연구를 수행하는 주요 이유는 1) 전연기 또는 연기 성분들의 작용 기작 연구 2) 특정 질환의 발생기전 연구 및 질환 예측 조기 지표들의 개발 3) 위험감소제품의 선별 및 위해성 감소효과를 입증하기 위해서이다.

생체 내 독성평가는 담배 첨가물(향료, 보습제), 재료품, 제품 설계 변경 시 담배연기 고유의 독성 증가 또는 감소 여부를 시험하여 제품 보증에 활용될 수 있다. 동물 독성 시험은 식품첨가물 유사 물질에 대한 규제 승인 과정에 있어 중요한 요소로서 담배의 경우 규제 지침이 마련되어 있지는 않지만 많은 연구결과들이 보고되고 있다. EU 등의 담배첨가물에 대한 규제 감시는 향 후 이런 생체 내 시험에 대한 지속적이고도 구체적인 요구를 나타낸다. 또한 생체 내 독성평가는 신제품 및 잠재적 노출 감소 제품의 (potentially reduced exposure products, PREPs,) 독성 감소 정도 및 새로운 독성이 나타나지 않음을 증명하는 데 활용될 수 있으며 PREPs으로 승인을 받기위해서 절대적으로 필요한 시험과정이다.

3. 담배연기 흡입시험

담배연기의 흡입독성을 평가하기 위해서는 일반

동물 독성 평가방법을 따를 것을 권고한다 (National Toxicology Program, 2006). FTC/ISO 흡연조건에서 주류연을 대상으로 3 농도 시험을 하여야 하며 표준 담배 또는 대조담배를 함께 시험하여야 한다. 시험과정에 있어 동물실험의 설계, 수행 및 분석에 대한 표준 지침인 EPA나 OECD 413에 준할 것을 권장한다 (EPA, 1998; OECD 413, 1981a, 1981b; FDA GLP). 또한 실험동물에서 담배연기 노출량을 측정하는 것은 매우 중요하다. 대표적인 90일 아만성 흡입독성 시험을 요약하면 Table 1과 같다 (Lee, 2007).

3.1. 방법적 측면에 있어서 고려 사항

생체 내 독성 시험에 있어 매우 중요한 것은 생체 내로 흡수된 에어로졸 양을 정확하게 측정하는 것이다. 에어로졸 노출에 기인한 흡입량은 에어로졸의 농도, 동물의 호흡률 (분당 호흡량), 흡입한 시험물질의 deposition efficiency 및 노출 기간에 따라 다르기 때문에 내부용량을 결정하는 것이 어렵다. 인체에서 독성 발현, 독성 예측 및 독성 감소정도를 평가하기 위해 생체 내 연기 흡입 모델을 이용할 경우 아래의 사항들을 고려하여야 한다.

3.1.1. 노출량 결정

대부분의 생체 내 독성 평가 시험에서 시험 물질에 대한 노출 수준은 상대적으로 짧은 시간내에

Table 1. 90일 아만성 흡입독성 시험 설계

항 목	OECD 413 시험 방법
노출방법	비강노출
노출/회복 기간	13주 담배연기 비강 노출/6~13주 회복
노출시간/일, 주	1~6시간/일, 5-7일/주
농도	3 농도 (60~800µg/L WTPM)
연기 분석 항목	WTPM, CO, 입자크기, 니코틴, 알데하이드 등
시험동물	Male, female 흰쥐 (10~20마리/성/군)
노출 생체 지표	COHb, 혈액 또는 뇨 중 니코틴/코티닌
생체 영향 평가	임상화학, 혈액학, 병리조직학 검사
Special endpoints	폐 기관지 세정액 생체지표

(Lee, 2007)

통계학적으로 측정 가능한 생물학적 반응을 얻기 위해서 인체에 노출되는 양 보다 높게 설정되며 동물 성별 당 10~50 마리로 시험한다. 의약품의 경우 아만성, 만성 독성평가에 대한 최고 노출량 지침이 있으나 담배의 경우는 매우 달라서 노출 수준의 결정은 주 시험자의 판단에 따르는 경우가 많다. 담배연기 노출 시 최고 농도는 혈중 CO 양에 의해 결정되며 CO의 흡수량의 생체 지표로 carboxyhemoglobin (COHb)을 측정한다.

담배 간 비교 시험의 경우 미량으로 존재하는 DNA adduct 또는 hemoglobin adduct의 측정이 가능하면서도 동물들이 잘 견뎌낼 수 있는 연기농도를 최고 농도로 설정한다. 고농도 노출의 경우 호흡기계의 병리조직학적 병변이 너무 심해 제품 간 비교가 어려울 수 있기 때문에 중간농도 시험을 통하여 차이를 확인하여야 한다. 예를 들어 설치류에 담배연기 1200mg TPM/m³ 농도로 매일 1-2 시간 동안 90일간 담배연기를 노출시켰을 경우 동물 생존이나 체중 감소와 같은 일반적인 독성 평가는 무리가 없으나 첨가물 영향 평가에서처럼 병리조직학적 결과를 비교 평가할 경우에는 150~350mg TPM/m³ 정도의 중간 농도에서 시험하는 것이 유의성 있는 차이를 확인할 수 있다 (Gaworski 등, 1998).

대부분의 아만성 흡입시험은 EPA나 OECD 지침에 준해 수행된다 (EPA, 1998; OECD, 1981b). 담배 비교 평가를 위한 아만성 흡입독성 시험에서 전형적인 담배연기 노출 조건은 매일 1~5시간씩 하루 1~2회, 주당 5~7회로 13주 (90일)간 노출시험을 한다. 담배연기 농도, 노출 시간, 총 시험 기간 등의 다양한 조합으로 시험이 수행되어 왔으며 이들 노출 변수들의 조정이 특정 반응의 최대화, 시험기간 최소화 또는 전체 시험에 드는 비용 등의 절감 관점에서 연구자의 중요도에 따라 수행되어도 좋다. 최근 보고에 의하면 흰쥐에 하루 한시간 또는 두시간의 담배연기 노출은 하루 6시간 노출 시험의 결과와 유사하였으며 6시간 노출 시험의 어려움과 비용에 비해 훨씬 우수하였다 (Kaegler 등, 2001). 농도별 시험의 가장 중요한 이유는 관찰된 반응에 대한 용량-반응 평가에 대한 근거를 얻기 위함이다.

3.1.2. 연기노출 모드

담배연기는 화학적, 물리적으로 역동성이 있는 에어로졸로서 가능한 한 aging 없이 연기를 전달 하도록 설계되어야 한다. 또한 환경 중 담배연기 (ETS)의 경우 실제 ETS 환경에서 발생할 수 있는 화학적, 물리적 현상이 잘 나타나도록 희석시키고 aging시켜야 한다.

실험동물을 담배연기에 노출시키는 방법에는 whole-body (전신 노출) 또는 nose-only (비강 노출) 방법이 있다. 전신 노출 방법의 경우 담배연기가 털에 묻어 피부를 통해 흡수되거나 동물의 핏을 흡성으로 인해 경구로도 흡수될 수 있기 때문에 흡입량 및 영양생체지표에 대한 평가의 신뢰도를 떨어뜨릴 수 있다. 또한 노출 챔버 내에서 담배연기가 aging됨으로써 연기의 물리, 화학적인 성질이 변화되고 동물이 내뿜은 담배연기를 다시 들이마실 수도 있다. 전연기 노출 방식의 장점은 노동력과 시험에 소요되는 비용이 적게 들며 동물들에 대한 스트레스가 적다는 점이다.

많은 연구자들이 동물의 호흡 zone 안으로 신선한 담배연기를 계속 공급할 수 있도록 고안된 튜브 (restraining tube) 안에 동물을 넣고 시험하는 nose-only mode를 선호한다 (Fig. 1). 내뿜은 담배연기를 다시 들이마시지 않아야 하며 동물 털 등에 담배연기가 묻지 않게 설계되어야 한다. 한편, restraining tube 안에 동물을 넣고 담배연기를 노출시킬 경우 동물의 체중이 감소하거나 스트레스 관련 신경 및 내분비계 요소들이 영향을 받

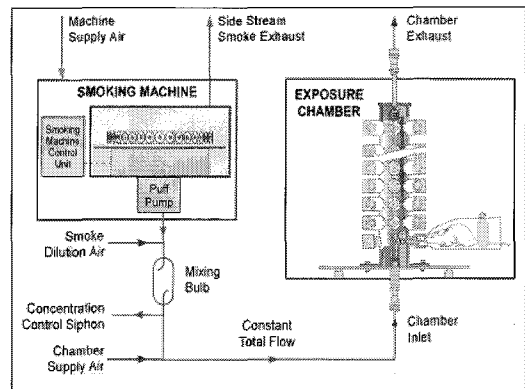


Fig. 1. 담배연기 노출 시스템 (nose-only)

담배적용 생체내 평가
-아만성 흡입독성 시험을 중심으로-

을 수 있다. 따라서 이를 최소화하기 위해 고안된 현대적 restraint 기구를 사용할 것을 권장하며 적절한 청정공기를 노출시킨 대조동물 (sham) 시험이 수반되어야만 한다.

3.1.3. 시험계와 품종의 선정

시험 목적에 부합되는 다양한 실험동물이 이용 가능하다. 흰쥐와 생쥐는 비교적 크기가 작고 사육 비용이 적게 들고 흰쥐는 담배연기에 대한 반응이 생쥐보다 다소 높아 조직병리학적 비교 시험에 많이 사용된다 (Wehner, 1989). 생쥐의 경우 폐 용적이 작아 분석용 시료로 사용되는 폐세정액 수집에 한계가 있다. Sprague-Dawley 흰쥐 모델은 흡입 노출 시험의 실험동물로 널리 이용되어 왔으며 주류연 및 부류연의 생물학적 평가를 위해 루틴하게 이용되어 왔기 때문에 이용 가능한 시험 데이터가 많은 장점이 있다.

3.1.4. 시험 물질: 담배

표준담배, 대조담배 및 시험용 담배는 ISO 표준 3402 (ISO, 1991b)에 따라 22 ± 1 °C, 상대습도 60 ± 2 %에서 48~72시간 조화한 후 시험에 사용한다. 시료 입수 후 사용 전까지는 -20 °C에 보관한다.

3.1.5. 노출 환경 모니터링

실험동물에 노출되는 담배연기 및 환경에 대한 유지 및 모니터링은 신뢰성 있는 시험결과를 도출을 위해 필수적이다. WTPM, CO, 니코틴 및 담배연기 입자를 정기적으로 측정하여야 하며 노출부위의 온도와 상대습도를 일정하게 유지해주고 모니터링 해야 한다 (온도: 22 ± 1 °C, 상대습도: 55 ± 10 %).

3.1.6. 노출 생체 지표 측정

담배연기 노출 2주차 및 12주차에 혈 중 COHb 및 혈중 니코틴 함량 또는 뇨 중 니코틴 등 대사물 6종의 배출량을 측정한다.

3.2. 담배연기 흡입시험의 생물학적 영향 평가

3.2.1. 체중, 임상적 관찰, 생존률, 조기 치사율

체중은 노출 및 회복기간 동안 2주에 한번 측정하여야 하며 매일 독성 징후가 있는 지, 동물의 생존 여부 등을 관찰한다.

3.2.2. 폐기능

담배연기 노출 3, 7 및 13주 차에 plethysmography를 이용하여 일회 호흡 용적, 호흡률, 분당 호흡량 및 기도저항을 측정한다.

3.2.3. 호흡기에 연기 침착

일반 설치류 실험동물들은 비강을 통해 호흡을 하기 때문에 상기도에 있는 후각기 구조가 고도로 발달되어 있고 복잡하다. 따라서 사람에게 비해 상기도에 더 많은 연기가 침착되고 연기 가스상의 화학적 상호작용 및 병리조직학적 변화가 더 많다 (사람의 경우 연기가 인두를 거쳐 하기도로 유입됨). 담배 간 비교 시험 시 최대 관심사인 병리조직학적 변화가 폐 보다 비인두 및 후두에서 자주 일어나는 이유이기도 하다.

화학물질들을 호흡기에 독성 영향의 징후 부위로 분류할 수 있으며 이들의 작용 부위는 물질 자체의 화학적, 물리적 특성에 의해 결정된다. 인두, 코 및 후각기에 영향을 미치는 상기도 자극물질들은, 호흡기내 수용성 점액 층 안으로 쉽게 확산될 수 있는 수용성이 높은 물질들이다. 암모니아, 포름알데히드 및 아크로레인 같은 연기성분은 대표적인 상기도 자극물질로서 실험동물의 상기도에서 관찰되는 연기독성 징후에 유의성 있게 기여한다. 이들 자극물질들은 호흡에 영향을 주어서 이는 담배 간 비교 평가에 활용할 수 있다.

폐속 깊이 자극을 줄 수 있는 물질들은 수용성이 낮은 가스와 기체상으로 작은 연기방울로 존재하며 가스교환부위인 폐포까지 도달한다. 들이마신 입자의 침착 부위는 에어로졸 입자의 공기역학적 질량 중위 직경 (mass median aerodynamic diameter)에 비례하는 데 입자 크기가 작을수록 폐속 깊이 들어간다. 신선한 담배연기의 입자 크기는 마이크로 이하이어서 폐 깊숙이 이동되어 확산과 침전에 의해 폐 깊숙이 들어가 침착된다. 코로 호흡하는 설치류의 경우 담배연기 입자가 폐 깊숙한

지역으로 침투하는 것이 인체 흡연에서 보다 덜 효과적이다. 설치류 기도 하부에서 연기입자의 유입과 침착은 60~90%에 이른다 (Chen 등, 1995).

3.2.4. 병리학

호흡기계의 조직 및 장기의 병리조직학적 분석은 담배연기 흡입시험에서 중요 관심사이다. 실험동물에 몇 주 또는 일생을 통해 담배연기를 노출시킨 후 (최고 허용 농도) 호흡기의 병리조직학적 변화를 보면 유사한 반응이 나타나며 노출 농도나 시간에 따라 심각한 정도는 달라질 수 있다. 초기의 변화로는 호흡기 상부 및 중간 수준에 있는 다양한 상피세포 표면에서 세포의 과형성 (hyperplasia)이 관찰된다. 고농도 또는 장기간의 노출은 화생(metaplasia) 또는 세포 유형의 변화를 유발한다. 호흡기 조직으로부터 입자오염물질들을 제거하기 위해 점액을 위쪽으로 밀어 올리는 섬모세포는 카보닐과 같은 세포독성이 있는 연기성분에 의해 섬모기능이 손상될 수 있다. 연기에 노출된 섬모세포는 섬모가 손실되어 무섬모 상피로 대체될 수도 있다. 반복되는 고농도의 담배연기 노출에 대해 방어하기 위해 점액을 생성하는 배상세포의 수가 증가되고 외관이 변할 수도 있다. 대부분의 이러한 변화는 전암상태로의 변화라기 보다는 연기 자극에 대한 적응 반응으로 설명된다 (Burger 등, 1989).

흰쥐의 경우 후두부는 병리조직학적 관점에서 가장 민감하고 반응성이 있는 부위이기 때문에 병리조직학적 평가에 특별한 관심 대상이 된다 (Sagartz 등, 1992). 담배연기 노출 동물 시험에서 폐조직은 전형적으로 병리조직학적 변화가 한정되어 있는 데 폐에 침착된 입자물질들을 제거하는 대식세포가 많아지는 것이 공통적으로 나타나는 현상이다. 위에 언급한 이런 변화들은 고도로 가역적이며 아직까지 완전하게 특성이 규명되지 않았다.

4. 담배첨가물 아만성 흡입독성 평가

4.1. 개요

담배 첨가물의 독성평가에 대한 주안점은 첨가물 사용으로 인하여 기존 담배의 독성이 증가

또는 감소되었는 지의 여부를 판단하여 사용 여부를 결정하는 데 있다. 첨가물 수용도 평가 과정은 첨가물 단일 성분 또는 혼합물에 대한 연기분석, 유전독성 평가, 세포독성 평가 및 흡입독성 평가로 이루어져 있다. 여기서는 Vanscheeuwijck 등 (2002)이 보고한 자료를 인용하여 첨가물 333종에 대한 흡입독성 평가법 및 주요 결과를 소개하였다. Vanscheeuwijck 등은 담배 제조에서 흔히 사용되는 첨가물 333종을 3개의 군으로 나누어 high와 low 농도로 담배에 첨가하여 시험용 담배를 조제하였다. 담배연기를 흰쥐에 150 ug TPM/L의 농도로 매일 6시간씩 90일간 노출시킨 후 흡입독성을 평가하였다. 대조군에 비해 첨가물이 들어간 시험군 간에 괄목할만한 생리적, 생화학적 및 병리조직학적 차이가 없었다. 이는 333개의 첨가물들의 사용 농도를 높였을 때도 담배연기의 독성을 증가시키지 않음을 의미한다.

4.2. 시험 방법

4.2.1. 시험 설계

모든 시험은 OECD guideline 413과 OECD GLP 기준에 준하여 실시하였다. 청정공기 (sham), 표준담배인 1R4F, 대조담배, 시험담배의 연기를 150 ug TPM/L의 농도로 매일 6시간씩 주 당 7일간 총 90일동안 흰쥐에 노출시켰으며 42일간 회복기를 가졌다. 각 군 당 male, female 실험동물들 각 10 마리씩 (대조군은 14마리) 사용하였다.

4.2.2. 실험동물 및 사육

Sprague Dawley 흰쥐 (male, female) 5주령을 구입하여 8일간 적응시켰으며 성별로 5마리의 동물을 골라 미생물 검사, 호흡기계 및 장기의 병리적 검사 후 시험에 사용하였다. 실험동물들은 SPF 시설에서 사육하였으며 온도는 $21 \pm 1^\circ\text{C}$, 상대습도 $58 \pm 4\%$, 명/암 사이클은 12시간씩 교대로 유지하였다.

4.2.3. 시험 담배 제조

첨가물을 넣은 시험담배를 Ingredient Group 1 (Casing materials, volatile top flavorings, 관상엽에 사용되는 첨가물, IG 1), Ingredient Group 2

(Casing materials, volatile top flavorings, IG 2) 및 Ingredient Group 3 (Casing materials, menthol, IG 3)로 나누었다. 첨가물의 농도는 통상적으로 담배에 사용되는 농도인 low level과 1.5 또는 3배에 해당하는 high level 수준이 되도록 담배엽의 7~15%를 첨가물로 대체하여 대조 담배와 무게를 맞추었다.

4.2.4. 담배연기 노출 및 노출 환경 모니터링

30 포트 흡연장치를 사용하여 ISO 3308 (ISO, 1991a) 표준 흡연조건에서 담배 연기를 발생시켰으며 (35mL, 2초 흡연시간, 흡연간격 60초) 담배연기를 청정공기와 섞어 WTPM 농도가 150ug/L되게 조절하여 담배연기를 Sprague-Dawley 흰쥐의 비강을 통해 노출시켰으며 노출 튜브의 온도는 $22 \pm 1^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 4\%$ 로 조절하였다.

노출 부위의 연기를 채취하여 TPM, CO, aldehyde (formaldehyde, acetaldehyde, acrolein), nicotine, nitrogen oxide, 입자분포, 온도 및 상대습도를 정기적으로 분석, 모니터링하였다.

4.2.5. 생물학적 영향 평가

실험동물 개개의 체중 및 사료 섭취량을 주당 한번 측정하였으며 동물의 생존여부와 건강상태를 매일 관찰하였다.

호흡율, 호흡용적, 분당 호흡량을 전신 plethysmography를 이용하여 biomonitoring하였으며, 담배연기 노출량 평가를 위해 혈중 carboxyhemoglobin과 24시간 수집한 뇨에서 니코틴 대사물 (nicotine, cotinine, hydroxycotinine, nicotine glucuronide, cotinine glucuronide, hydroxycotinine glucuronide) 총량을 분석하였다 (Rustemeier 등, 1993).

Pentobarbital 마취제를 주사하여 동물을 마취시킨 후 채혈하여 OECD guideline (OECD, 1981b)에 기재된 혈액학 및 임상화학 시험항목들을 분석하였다. 부검 시 체내의 장기 조직을 육안으로 검사하여 병변의 유무를 관찰하였으며 개체 별 장기의 중량을 측정하였다.

폐, 기도 및 후두의 병리조직학적 검사를 위해 각 장기를 EAFS로 고정한 후, 조직을 일정한 두

께로 삭정, 조직처리, 파라핀 포매를 거쳐 조직절편을 제작한 후 Hematoxylin & Eosin 염색을 실시하였다 (Fig. 2). 그 외 검체 제작된 후두에 대해 피열투영상피세포의 두께를 측정하였다.

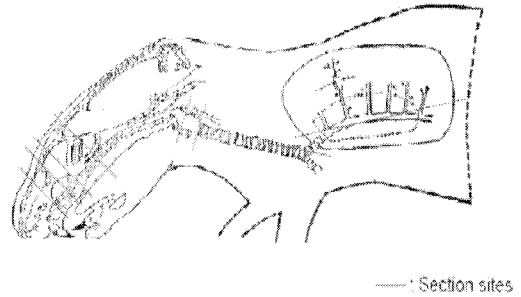


Fig. 2. 병리조직검사를 위한 호흡기계의 삭정부위

4.2.6. 통계 분석

등분산 데이터의 경우 One-way analysis of variance (ANOVA)를 실시하여 유의성이 관찰되면 대조군과 유의차가 있는 시험군을 확인하기 위해 Duncan test의 다중검정을 실시하였다 (유의수준 : 양측 5% 및 1%).

4.3. 시험 결과 및 고찰

4.3.1. 주류연 조성

담배연기 노출부위의 연기 성분 분석 결과, IG 2에서 formaldehyde, nicotine, nitric oxide 및 nitrogen oxides 함량이 대조군에 비해 낮았으며 반면 IG 3의 경우 formaldehyde의 함량이 높았다. 입자크기 분포는 $0.48 \pm 1.7 \mu\text{m}$ 로 유의한 차이가 없었다 (Table 2).

4.3.2. Biomonitoring

4.3.2.1. 호흡 기능

Sham 대조군에 비해 담배연기 노출 흰쥐의 호흡률이 20% 낮았으며 일회 호흡용적은 변화가 없었다. 첨가물 시험군과 대조군간에는 유의한 차이가 없었다.

4.3.2.2. 노출 생체 지표(CO_hb, Nicotine metabolites)
대조군의 CO_hb 농도는 $24.1 \pm 0.7\%$ 이었으며 시험

Table 2. 희석시킨 주류연에서 연기 성분의 농도 (Vanscheeuwijck 등, 2002).

번 수	Unit	Sham	Control	IG 1 High	IG 2 High	IG 3 High
TPM	ug/L	< DL	149±6	149±6	149±5	151±8
CO	ppm	< DL	172±7	163±8	178±7	183±11
Nicotine	ug/L	n.d.	10.1±0.8	10.4±1.0	8.6±0.6	10.6±1.9
Formaldehyde	ppm	n.d.	0.33±0.02	0.35±0.03	0.27±0.02	0.39±0.04
Acetaldehyde	ppm	n.d.	7.66±0.38	7.20±0.38	7.48±0.44	8.38±0.58
Acrolein	ppm	n.d.	0.51±0.03	0.53±0.03	0.55±0.03	0.56±0.04
NO	ppm	n.d.	4.4±0.2	4.1±0.3	3.8±0.2	5.5±0.4
NOx	ppm	n.d.	4.6±0.3	4.6±0.3	4.0±0.1	5.7±0.5

Data are given as mean±S.D.; <DL: below detection limit; n.d.: not determined
 Detection limit: TPM 0.9ug/L, CO 1.5ppm, nicotine 0.58ug/L

군과 유의한 차이가 없었다. Nicotine 흡수의 생체 지표인 뇨 중 니코틴 대사물의 함량도 모든 그룹에서 유의한 차이가 없었다. 이는 담배 첨가물이 연기의 흡수에 영향을 주지 않음을 의미한다.

4.3.3. 생물학적 결과

4.3.3.1. 체중, 사료 섭취량 및 생존률

90일간 담배연기를 흡입시킨 웅성 흰쥐의 경우 sham group에 비해 체중이 20~28 % 감소하였는데 이는 담배연기의 독성과 자극에 기인한 스트레스와 상관관이 있는 것 같다. 니코틴과 아크롤레인이 이런 영향에 기여하는 인자가 된다. 모든 시험군에서 IG 2 high level의 체중감소는 20 ± 2 %로 다른 시험군 평균치인 28 ± 1 %에 비해 유의하게 낮았는데 이는 니코틴 함량이 더 낮았기 때문으로 사료된다. 사료 섭취량은 담배연기 흡입군 보다 sham에서 많았으며 sham 및 흡연시킨 모든 동물의 생존률은 100 % 이었으며 첨가물로 인한 독성 징후도 보이지 않았다.

4.3.3.2. 임상 화학

담배연기 흡입 후 간에 존재하는 alkaline phosphatase, alanine aminotransferase 및 aspartate aminotransferase의 활성이 두배 증가하였다. 이는 담배연기 흡입으로 간에서 지질과산화 반응이 증가되었기 때문으로 생각된다 (Table 3). 담배연기

a를 흡입시킨 동물의 혈중 콜레스테롤 및 glucose 농도는 40 % 감소하였으며 female 흰쥐의 경우 triglycerides의 농도가 감소하였다. 이러한 변화들은 담배연기에 노출된 흰쥐의 영양 상태가 약간 변화되었기 때문으로 사료된다.

4.3.3.3. 혈액학

모든 담배연기 흡입군에서 백혈구 수치가 48% 증가하였으며 호중구 수치는 175% 높았으며 림프구는 60% 감소하였다. 대조군과 시험군 간에는 유의한 차이가 없었다.

4.3.3.4. 호흡기계의 병리학

13주 담배연기 흡입 후 sham 대비 담배연기 노출군의 후두와 기도의 절대 중량 및 폐 중량 대비 상대 중량이 유의하게 증가되었다 (Table 4).

조직병리학적 변화가 호흡기계 상피에서 일어났으며 제일 앞쪽 비강 부위에서 예비세포수의 증가, 배상 세포수 증가 및 편평 화생이 관찰되었다. 비강 level 2에서 예비세포 증식증이 관찰되었으나 심하지는 않았으며 level 2, 3, 4에서 후각 상피의 위축증과 편평화생이 관찰되었다.

후두에서 편평화생의 증가, 거짓중층상피세포의 편평화생, 입방상피세포의 증생 및 편평화생이 관찰되었다. 후두 상피세포는 담배연기노출군이 sham에 비해 두꺼워졌다.

담배적용 생체내 평가
-아만성 흡입독성 시험을 중심으로-

Table 3. 90일 담배연기 흡입시험 후 임상화학적 변수 (웅성 흰쥐).

변 수	Unit	Sham	Control	IG 1 High	IG 2 High	IG 3 High
ALP	U/L	138±6	227±16	227±15	202±18	205±13
ASP	U/L	52±3	61±3	59±4	62±3	59±2
AAT	U/L	44±3	60±3	53±4	52±3	59±3
γ-GT	U/L	0.7±0.1	0.6±0.1	0.6±0.1	0.6±0.1	0.6±0.1
Total Cholesterol	nmol/L	1.7±0.1	1.3±0.1	1.3±0.1	1.4±0.1	1.4±0.1*
Triglycerides	nmol/L	0.7±0.1	0.7±0.1	0.6±0.1	0.8±0.1	0.6±0.1
Glucose	nmol/L	14.3±0.8	11.7±0.7	11.5±0.6	13.5±2.4	12.5±0.7
Urea	nmol/L	6.9±0.3	9.0±0.4	8.3±0.6	8.2±0.5	7.5±0.4*

(Vanscheeuwijck 등, 2002)

Data are given as mean±standard error ; ALP: Alkaline phosphatase;

ASP:Aspartate aminotransferase; AAT: Alanine aminotransferase;

γ-GT: γ-Glutamyltransferase; * 대조군과 유의한 차이가 있음

기도의 경우 모든 흡연군에서 때때로 호흡상피의 예비세포수와 배상세포수의 증가가 관찰되었다. 시험군과 대조군의 배상세포수의 증가정도는 비슷하였다.

호흡기 상피의 배상세포수의 증가가 모든 흡연군의 폐에서 관찰되었으며 웅성 흰쥐에서 보다 female 흰쥐에서 더 심하게 나타났다. 또한 모든 흡연군에서 색소성 폐포 대식세포가 발견되었다.

담배연기를 흡입시킨 모든 군에서 일관된 병리조직학적인 변화가 관찰되었으며 이러한 변화들의 심각한 정도는 다소 차이가 있지만 비강 상피에서 일반적으로 대조군 대비 병리조직학적 변화가 낮았으며 female 군의 경우 반대 양상이 관찰되었다. IR4F를 노출시킨 웅성흰쥐의 경우 대조군과 유사

하였으나 시험군에 비해서는 약 20% 높게 나타났으며 female의 경우 병리조직학적인 변화의 심각성이 대조군보다 30% 높았으며 시험군과는 비슷하였다.

IG 1 high level cigarettes의 담배연기에 노출된 female 흰쥐의 경우 비강 호흡상피 level 1에서 예비세포 증생이 대조군보다 유의하게 높았다. 이는 level 2 및 웅성 흰쥐에서는 나타나지 않았으므로 중요하지 않게 생각된다.

IG 2 담배연기에 노출된 웅성 흰쥐의 비강상피에서 관찰되는 병리조직학적인 변화는 대조군 보다 약간 적었다. 유일하게 level 2에서 후각상피의 위축이 발견되었다. 반면 female 흰쥐에서는 IG 2 노출군의 비강상피에서 병리조직학적인 영향이 대

Table 4. Sham, 대조군, 시험군 및 IR4F 담배 연기 90일 흡입 후 웅성 흰쥐의 절대/상대 장기 중량.

변수	Sham	Control	IG 1 High	IG 2 High	IG 3 High
절대중량(g) 폐+기도+후두	1.47±0.1	1.38±0.03	1.46±0.03	1.53±0.04*	1.46±0.05
상대중량(1xE-4) 폐+기도+후두	37.2±0.7	47.9±0.6	50.5±2.4	47.0±1.3	48.1±0.7

* 대조군과 유의한 차이가 있음

Table 5. 90일 흡입시험 후 흰쥐의 후두상피 두께.

변수	Sham	Control	IG 1 High	IG 2 High	IG 3 High
Male rats	9.8±0.6	16.6±0.9	16.8±1.3	19.0±1.4	19.8±2.4
Female rats	9.3±0.4	20.5±1.1	18.2±1.5	20.5±1.6	19.9±2.4

unit: um

조군에서 보다 더 심했다. level 2와 3에서 비강 부위에 위축이 관찰되었으며 비강 level 4 (high ingredient level)에서 편평화생이 발견되었다.

IG 3 low level 담배에 노출된 웅성흰쥐의 경우, 후두바닥의 상피 두께가 대조군에 비해 유의하게 증가되었다. Group 3 female 흰쥐의 경우 오히려 상피두께가 대조군 보다 얇았다. 이는 이 부위에서 거짓중층상피의 편평화생 정도가 더 적은 정도와 비슷하였다.

4.4. 결 론

첨가물은 담배 연기의 흡입독성에 영향을 주지 않았다. 첨가물을 넣었을 때 연기 조성에 있어 얼마간의 차이가 있긴 했지만 흡입시험에서 생물학적인 영향을 초래할 정도는 아니었다. 또한 실험실 적 독성평가의 결과도 흡입독성 결과와 같이 첨가물에 의한 독성 차이를 유발하지 않았다 (Roemer 등, 2002). 즉, 공통적으로 사용되는 333 개의 첨가물들을 담배에 첨가하였을 때 고농도로 사용되었을 때 조차도 주류연의 생물학적 활성을 증가시키지 않았다.

5. 요 약

생물학적으로 활성이 있는 물질들의 생체 내 대사를 이해하고 인체 독성 및 질환의 발현을 예측할 수 있는 가장 좋은 시험방법은 생체 내 독성 평가법이다. 담배연기의 생체 내 독성 평가법에는 14일 흡입독성시험, 90일 흡입독성 시험 및 피부도 말 중앙발생 시험 등이 있다. 90일 흡입독성 시험은 담배의 일반적인 독성 정보를 제공한다. 생체 내 독성평가는 담배 첨가물, 재료품 또는 제품 설계를 변경할 경우 담배연기 독성이 증가 또는 감소되었는지를 평가할 수 있으며 이 결과는 제품

보증에 활용될 수 있다. 캐나다의 독성평가자료 제출 및 EU 등의 담배첨가물에 대한 규제는 향 후 이런 생체 내 시험에 대한 지속적이고도 구체적인 요구를 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Baker, R. R., Massey, E. D. and Smith, G. (2004) An overview of the effects of tobacco ingredients on smoke chemistry and toxicity. *Food Chem Toxicol.* 42 Suppl: S53-S83.
- Bogen, K. T. and Witschi, H. (2002) Lung tumors in A/J mice exposed to environmental tobacco smoke: estimated potency and implied human risk. *Carcinogenesis* 23(3): 511-519.
- Burger, G. T., Renne, R. A., Sagartz, J. W., Ayres, P. H., Coggins, C. R., Mosberg, A. T. and Hayes, A. W. (1989) Histologic changes in the respiratory tract induced by inhalation of xenobiotics: physiologic adaptation or toxicity? *Toxicol Appl Pharmacol.* 101(3): 521-542.
- Chen, B. T., Benz, J. V., Finch, G. L., Mauderly, J. L., Sabourin, P. J., Yeh, H. C. and Snipes, M. B. (1995) Effect of exposure mode on amounts of radiolabeled cigarette particles in lungs and gastrointestinal tracts of F344 rats. *Inhalation Toxicology* 7(7): 1095 - 1108.
- Coggins, C. R. (2001) A review of chronic inhalation studies with mainstream cigarette smoke, in hamsters, dogs, and nonhuman

담배적용 생체내 평가
-아만성 흡입독성 시험을 중심으로-

- primates. *Toxicol. Pathol.* 29(5): 550-557.
- EPA Guideline (1998) Health effects test guidelines OPPTS 870.3465 90-day inhalation toxicity. EPA 712-C-98-204
- Finch, G. L., Nikula, K. J., Belinsky, S. A., Barr, E. B., Stoner, G. D., and Lechner, J. F. (1996) Failure of cigarette smoke to induce or promote lung cancer in the A/J mouse. *Cancer Lett.* 99(2): 161 - 167.
- Gaworski, C. L., Dozier, M. M., Heck, J. D., Gerhart, J. M., Rajendran, N., David, R. M., Brennecke, L. H. and Morrissey, R. (1998) Toxicological evaluation of flavor ingredients added to cigarette tobacco: 13-week inhalation exposure in rats. *Inhalation Toxicology* 10(4): 357-3381
- Gaworski, C. L., Heck, J. D., Bennett, M. B. and Wenk, M. L. (1999) Toxicologic evaluation of flavor ingredients added to cigarette tobacco: skin painting bioassay of cigarette smoke condensate in SENCAR mice. *Toxicology.* 139(1-2): 1-17.
- International Organization for Standardization: International Standard
- ISO 3308, 1991a. Routine analytical cigarette-smoking machine - .
Definitions and standard conditions, 3rd edition.
International Organization for Standardization: International Standard
- ISO 3402, 1991b. Tobacco and tobacco products - . Atmosphere for conditioning and testing, 3rd edition.
- Kaegler, M., Anskait, E., Teredesai, A., Vanscheeuwijck, P. and Terpstra, P. (2001) Suitability of different exposure regimens in inhalation studies with cigarette smoke. Abstract #2054. *The Toxicologist* 60(1): 431.
- Lee, K. M. (2007) Characterization of cigarette smoke toxicity using rodent inhalation models. Presented at the International Symposium for the KOSTAS, October 5th National Toxicology Program (2006) Description of NTP study types. Available at <http://ntp.niehs.nih.gov/ntpweb/index.cfm?objectid=72015DAF-BDB7-CEBA-F9A7F9CAA57DD7F5> Accessed 3-28-2006
- Organizaion for Economic Cooperation and Development (1981a) Test No. 412. Repeated dose inhalation toxicity: 28-day or 14-day inhalation study. In: OECD Guideline for Testing Chemicals. Paris: OECD.
- Organizaion for Economic Cooperation and Development (1981b) Test No. 413. Subchronic inhalation toxicity: 90-day study. In: OECD Guideline for Testing Chemicals. Paris: OECD.
- Roemer E., Tewes F.J., Meisgen T. J., Veltel D., and Carmines E. L. (2002) Evaluation of the potential effects of ingredients added to cigarettes. Part 3: in vitro genotoxicity and cytotoxicity. *Food and Chemical Toxicology* 40, 105 - 111.
- Roffo, A. H. (1937) Der Tabak als Krebs erzeugender Ageus. *Deutsche Med. Wehnschr.* 63: 1267-1271.
- Rustemeier, K. Demetriou, D., Schepers, G. and Voncken, P. (1993) High-performance liquid chromatographic determination of nicotine and its urinary metabolites via their 1,3-diethyl-2-thiobarbituric acid derivatives. *Journal of Chromatography* 613, 95-103.
- Rustemeier, K., Stabbert, R., Haussmann, H. J., Roemer, E. and Carmines, E. L. (2002) Evaluation of the potential effects of ingredients added to cigarettes. Part 2. Chemical composition of mainstream smoke. *Food and Chemical Toxicology* 40, 93-104.
- Sagartz, J. W., Madarasz, A. J., Forsell, M. A., Burger, G. T., Ayres, P. H and Coggins, C. R. (1992) Histological sectioning of the rodent larynx for inhalation toxicity testing.

- Toxicol Pathol.* 20(1): 118-121.
- Terpstra, P. M., Teredesai, A., Vanscheeuwijck, P. M., Verbeeck, J., Schepers, G., Radtke, F., Kuhl, P., Gomm, W., Anskait, E. and Patskan, G. (2003) Toxicological evaluation of an electrically heated cigarette. Part 4: Subchronic inhalation toxicology. *J Appl Toxicol.* 23(5): 349-362.
- St. Hilaire, C. L. (2007) LSRO report on scientific methods to evaluate potential reduced-risk tobacco products. St. Hilaire, C. L. ed., Life Sciences Research Office, USA
- Tricker, A. R. (2000) Toxicology of tobacco-specific nitrosamines. *Recent Advances in Tobacco Science* 27: 75-102.
- Vanscheeuwijck, P. M., Teredesai, A., Terpstra, P. M., Verbeeck, J., Kuhl, P., Gerstenberg, B., Gebel, S. and Carmines, E. L. (2002) Evaluation of the potential effects of ingredients added to cigarettes. Part 4: subchronic inhalation toxicity. *Food Chem Toxicol.* 40(1): 113-131.
- Wehner, A. P. (1989) Inhalation exposure of rodents to mineral fibers and cigarette smoke: What did we learn? In *Biological Interaction of Inhaled Mineral Fibers and Cigarette Smoke*, Wehner, A. P. and Felton, D. L. eds, Columbus, OH: Battelle Press
- Witschi, H., Espiritu, I., Maronpot, R. R., Pinkerton, K. E. and Jones, A. D. (1997) The carcinogenic potential of the gas phase of environmental tobacco smoke. *Carcinogenesis.* 18(11): 2035-2042.
- Witschi, H., Espiritu, I., Dance, S. T., Miller, M. S. (2002) A mouse lung tumor model of tobacco smoke carcinogenesis. *Toxicol. Sci.* 68(2): 322-330.
- Wynder, E. L. and Hoffman, D. (1963) Experimental aspects of tobacco carcinogenesis. *Dis. Chest* 44: 337-344.
- Yoshimura, H., Yoshino, K., Lulham, G. W., Lee, K. M. and Renne, R. A. (2006) Comparison of cigarette smoke toxicity with various inhalation exposure regimens. Presented at the national Society of meeting.