

나노물질을 이용한 다세대전이 및 독성 연구 추세

Trend of Multigenerational Transfer and Toxicity Studies Using Nanomaterials

문종민 · 안윤주[†]

Jongmin Moon · Youn-Joo An[†]

건국대학교 보건환경과학과

Department of Environmental Health Science, Konkuk University

(Received March 10, 2016; Revised April 20, 2016; Accepted May 13, 2016)

Abstract : Nano-safety has become an emerging issue recently, because of the broad use of nanomaterials in nano-industries and commercial areas. For a sustainable development in the nano-industry, active studies on nano-safety should be executed, especially on the potential risks in engineered nanomaterials (ENMs). Although acute and chronic assessments of nanomaterials have been extensively studied in many studies, multigenerational studies are very scarce. Overall, multigenerational studies have progressed as two different trends, studying post-generational effects or trans-generation effects. This study intended to suggest further nano-safety studies based on the trends and limitations of current ones. Through a comparative analysis, we investigated peer-reviewed multigenerational studies that used nanomaterials. Thirteen studies on post-generation effects confirmed generational nano-toxicity via several bioassays, such as mortality, fertility, and behavioral assays. Seven studies on trans-generation effects demonstrated nanomaterial pathways to next generations, using imaging techniques. Until now, mechanisms for post-generational nano-toxicity has been rarely proposed. Thus, we propose that complementary studies on such mechanisms are imperative for future studies.

Key Words : Multi-generational Study, Postgenerational Effect, Generational Transfer, Nanomaterial

요약 : 최근 나노물질의 산업 및 생활분야의 광범위한 사용으로 인한 나노안전성이 대두되고 있다. 특히 다양한 목적에 의해 가공된 나노물질의 잠재적 독성이 문제가 되고 있기 때문에, 지속가능한 나노물질 산업의 발전을 위해서는 적극적인 나노 안전성에 대한 연구가 진행되어야 한다. 현재까지 나노물질의 일반적 급성, 만성독성에 대한 연구는 비교적 활발하게 진행되고 있지만, 나노물질의 다세대 영향에 대한 연구는 시간적 및 실험적 제약으로 인해 미흡한 실정이다. 생태계 내 나노물질의 다세대 연구는 일반적 독성 종말점을 이용한 후세대 영향 연구와 나노물질의 세대 간 거동을 확인한 세대전이 연구로 나뉘어 진행되고 있다. 본 연구는 나노물질의 다세대 영향 및 전이연구 추세를 확인하고 제한점을 제시하여 앞으로의 연구 방향을 제시하는데 그 목적이 있다. 나노물질에 대한 학술연구를 대상으로 문헌조사를 실시하였으며, 각 분야별 자료를 수집하고 비교분석하였다. 조사결과 후세대 영향을 확인한 연구는 총 13건 이었으며, 생존률, 생식률 그리고 운동성과 같은 지표를 이용하여 다음세대에 전달되는 영향을 확인하였다. 그리고, 7건의 세대전이 연구에서는 후세대로 전달된 나노물질을 다양한 이미징 기법을 통하여 확인하였다. 현재까지 나노물질이 후세대에 미치는 독성영향의 메커니즘은 밝혀진 바가 거의 없다. 본 연구에서는 나노물질의 다세대 연구추세를 분석하고, 후세대영향과 세대전이의 상호보완적 연구방향을 제시하였다.

주제어 : 다세대 연구, 후세대영향, 세대전이, 나노물질

1. 서론

나노물질(nanomaterials)은 최소 한 차원의 길이가 100 나노미터 이하가 되는 물질을 의미하며, 크기 및 표면구조, 모양 그리고 응집력으로 인해 특이한 물리 화학적 성질을 지니게 된다.¹⁾ 이러한 성질로 인해 나노물질은 반도체,²⁾ 화장품,³⁾ 전자제품⁴⁾ 그리고 특정한 부위에 약물을 전달하는 Drug delivery⁵⁾의 용도로 산업 여러 분야에서 널리 사용되고 있고, 나노물질 시장은 2015년까지 1조 달러 규모로 커질 것으로 예상되고 있다.¹⁾ 시장에서 유통되고 있는 나노물질의 종류는 매우 다양하며, 그 종류는 이용목적에 따라 다양한 형태로 제작이 가능한 탄소계(carbon-based), 다양한 금속을 이용하여 제작된 금속계(metal based) 그리고 이미징(imaging)을 목적으로 하는 형광나노물질(fluorescent nanomaterials)로 구분할 수 있다. 탄소계열 나노물질은 결

합 구조에 따라 nanodiamond, fullerene (C-60, C-540), 나노튜브 그리고 그래핀(graphene) 등으로 구분된다. 좀 더 세부적으로, 탄소나노튜브(carbon nanotube, CNT)는 단일벽(single-wall) 그리고 다중벽(multi-wall)로 구분되고,⁶⁾ 연료 전지 및 IT 기기에 사용되며,⁷⁾ Fluorescent nanodiamond (FND)는 생물의학 이미징 분야에 사용되기도 한다.⁸⁾ 금속계 나노물질의 경우, 살균작용이 있어 가정용 박테리아 필터나 수영장의 조류 제거용으로 사용되는 은나노물질(AgNPs),⁹⁾ 자외선 차단제나 페인트 염료 그리고 치료용으로 사용되는 이산화티타늄 나노물질(TiO₂NPs)¹⁰⁾ 그리고 전기화학적 성질에 의해 나노백신으로 사용되는 금 나노물질(AuNPs)¹¹⁾과 같은 나노물질들이 실제 산업 및 생활 전반에서 사용되고 있다. 또한 형광을 내는 특성을 이용하여 Quantum dots (QDs)은 생명영상분석¹²⁾ 및 LED (light-emitting diode) 디스플레이에¹³⁾ 사용되기도 한다.

[†] Corresponding author E-mail: anyjoo@konkuk.ac.kr Tel: 02-2049-6090 Fax: 02-2201-6295

이러한 나노제품들은 생산, 소비, 폐기과정에서 환경 내로 유출되어 표면집적, 강우, 침출수에 의해 매체 이동되어 생태계에 유출된다.¹⁴⁾ 생태계로 유입된 나노물질은 환경 중 다양한 매체에서 독성을 발현할 개연성이 있고, 나노물질이 산업과 생활에 광범위적으로 사용됨에 따라 나노물질이 가질 수 있는 잠재적인 독성의 평가는 나노기술의 지속 가능한 발전을 위해 꼭 필요하다.¹⁵⁾ 나노물질의 안정성을 평가하기 위한 연구는 매우 다양한 접근방법으로 진행되고 있으며 특히 생태계에 나노물질이 유입시 발생할 수 있는 다세대영향(multi-generation effect)관련 연구들이 진행되고 있다. 나노물질의 생태위해성이 여러 후세대 영향(post-generational effect) 및 세대전이(trans-generation)연구에서 확인되고 있지만 현재까지는 다세대 연구의 실험적 제약(장기간의 실험, 독성 기작 규명이 어려움)때문에 많은 연구가 이루어지지 않고 있다. 본 연구에서는 나노물질의 다세대 평가를 통해 나노 안전성 평가가 진행된 연구들을 심층적으로 조사하고, 나노물질로 인한 독성영향 및 세대전이 연구기법 등을 후세대 영향 또는 세대전이에 대한 연구로 나누어 분석하였다. 이를 기반으로 장차 다세대 나노물질 평가의 연구 방향을 제시하였다.

2. 나노물질의 다세대 연구 동향

2.1. 나노물질의 후세대 영향 연구

나노물질의 후세대 영향 연구는 2011년부터 2014년까지 13편의 연구가 조사되었고, C-60, CNT, QDs, Ag, Au, TiO₂, CeO₂ 그리고 ZnO NPs에 대한 연구가 진행되었다(Table 1). 여러 연구에서 다양한 생태독성 시험종을 이용하여 다세대 영향을 평가하였으며, 그 중 물벼룩¹⁶⁻¹⁹⁾을 이용한 연구가 4건으로 가장 많았고, 토양선충인 *Caenorhabditis elegans*²⁰⁻²²⁾를 이용한 연구가 3건, 토마토,²³⁾ 애기장대²⁴⁾와 같은 식물을 이용한 실험이 2건, 미생물^{25,26)}을 이용한 연구가 2건, 마지막으로 파리와에 속하는 *Drosophila melanogaster*²⁷⁾와 담·해수 서식종인 *Fundulus heteroclitus*²⁷⁾를 이용한 연구가 각각 1건씩 조사되었다. 나노물질 후세대 영향 연구의 시작은 2011년 Kumar et al.이 미생물 *Escherichia coli*²⁵⁾와 *Salmonella typhimurium*²⁶⁾을 이용하여 나노물질의 세대전이 독성을 연구한 것이다. 일반적으로 *E. coli*는 세포 분열을 하여 번식²⁸⁾하지만, Kumar et al.²⁵⁾은 *E. coli* strain K12를 ZnO와 TiO₂에 노출 한 뒤, 깨끗한 배지에 노출된 *E. coli*를 재분산시켜 배양한 세대를 다음 세대로 간주하여 계대전이

Table 1. Studies of post-generational effect using various biota exposed to nanomaterials

| Year | Test species | Nano materials | Media | Exposure pattern | Conc. a) | Toxicity value | Unit | Generation | Effects | Reference |
|------|--|---------------------------|--------------|------------------------------|-----------------------|--|--------------|------------|---|-----------|
| 2014 | <i>Daphnia magna</i> | Nano carbon | Liquid | Maternal | 50 | MWCNT LOEC: 10 C60-BCD LOEC: 10 C60-malonate LOEC: 5 | mg/L | F2 | Negative effects of mortality, reproduction and growth | 16) |
| 2014 | <i>Fundulus heteroclitus</i> | QDs | Liquid | Maternal | 10 | - | µg/fish | F1 | Decrease embryo deformities | 27) |
| 2014 | <i>Caenorhabditis elegans</i> | Ag NPs | Agar | Continuous | 2 | Lifespan LOEC: 100 Broodsize LOEC: 100 Length LOEC: 100 | mg/L | F3 | Negative effects of lifespan, reproduction, growth and locomotion | 20) |
| 2014 | <i>Arabidopsis thaliana</i> | Ag NPs | Soil | Continuous | 75 | - | µg/L | F3 | decrease of germination | 24) |
| 2014 | <i>Daphnia magna</i> | TiO ₂ NPs | Liquid | Continuous | 6 | NOEC: 2 LOEC: 5 | mg/L | F5 | Negative effects of mortality, reproduction and growth | 17) |
| 2013 | <i>Solanum lycopersicum</i> | CeO ₂ NPs | Filter paper | Continuous, maternal, single | 10 | - | mg/L | F1 | Decrease of Biomass at F1 | 23) |
| 2013 | <i>Caenorhabditis elegans</i> | Au NPs | Agar | Maternal | 50 × 10 ¹⁰ | Reproduction LOEC: 5 | particles/mL | F4 | Decrease of reproduction at F2 | 21) |
| 2013 | <i>Daphnia magna</i> , <i>Daphnia pulex</i> , <i>Daphnia galeata</i> | Ag NPs | Liquid | Continuous, maternal | 3.45 | <i>D. magna</i> EC ₅₀ : 121 <i>D. pulex</i> EC ₅₀ : 8.95 <i>D. galeata</i> EC ₅₀ : 13.9 | µg/L | F4 | Negative effects of mortality and reproduction | 18) |
| 2012 | <i>Daphnia magna</i> | TiO ₂ NPs | Liquid | Continuous | 2 | - | mg/L | F1 | Decrease of sensitivity | 19) |
| 2013 | <i>Caenorhabditis elegans</i> | QDs | Agar | Continuous | 50 | - | µM | F3 | Negative effects of lifespan, reproduction, growth and locomotion | 22) |
| 2011 | <i>Escherichia coli</i> strain K12 substrain DH10B | ZnO, TiO ₂ NPs | Liquid | Maternal | 80 | - | mg/L | - | Granularity | 25) |
| 2011 | <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Escherichia coli</i> | ZnO, TiO ₂ NPs | Liquid | Maternal | 80 | - | mg/L | - | Granularity | 26) |
| 2011 | <i>Drosophila melanogaster</i> | Ag NPs | Liquid | Continuous, maternal | 5 | EC ₅₀ : 20 | mg/L | F8 | Decrease of reproduction | 29) |

a) Highest exposure concentration in the study

후 시간에 따른 세포크기와 조밀도(*granularity*)를 분석하였다. 실험은 세포대사 활성에 기여하는 간세포의 S9 분획의 추가 유무로 나누어 ZnO+S9, Zn-S9, TiO₂+S9 그리고 TiO₂-S9의 4가지 분류로 나누어 실시되었다. 실험결과, ZnO-S9을 제외한 모든 노출군에서 세포 조밀도가 감소하는 것으로 나타났다. 이는 나노물질이 *E. coli*의 세포 분열을 저해하기 때문이며, S9 분획의 부재 시 상대적으로 크기가 큰 ZnO가 세포내부로 침투하기 어려운 것으로 보인다. 같은 해 Kumar et al.²⁶⁾은 다른 미생물 종인 *S. typhimurium*을 동일한 실험 방법으로 나노물질에 노출하여 같은 인자에 대한 분석을 진행하였다. 나노물질에 노출된 이후 깨끗한 배지로 옮겼을 때 다음 계대 미생물의 세포크기와 조밀도가 시간에 따라 감소하였고 이는 세포 내부에 침투한 나노물질을 세포 분열을 통해 제거하기 때문으로 설명되었다.

가장 많은 연구가 진행된 시험종인 *Daphnia magna*는 생식주기가 비교적 짧고 많은 독성 자료가 풍부하여 생태독성 시험종으로 많이 사용되는 종이다. Arndt et al.¹⁶⁾은 *D. magna*의 어미세대(F0)만 C60과 CNT에 노출시킨 후, 후세대(F1, F2)의 성장률과 생식능을 평가하였다. 탄소계열 나노물질은 물벼룩의 성장률의 적은 감소와 확인한 생식능 감소를 일으키는 것으로 관찰되었는데, 이는 일부 탄소계 나노물질에 의해 단백질 합성과 막 수송운반이 저해된 것으로 설명되었다. 또한 DNA 손상 및 면역체계 이상 등 후성적 영향이 발생될 개연성이 있으므로 유전학적 접근이 필요성을 제시하고 있다. Jacobasch et al.¹⁷⁾은 *D. magna*를 6세대(F0-F5) 동안 TiO₂NPs에 노출하여 동일하게 생식능과 성장률을 측정하였다. 총 6개의 농도로 이루어진 노출군을 F5 세대까지 관찰하여 *D. magna*의 예측무영향농도(predicted no-effect concentration)를 산출하고자 하였다. 그 결과 F3 세대까지는 생존률에 큰 영향은 보이지 않았으나 F4 세대부터 다소 증가하여 최저노출농도(1.19 mg/L)를 제외한 모든 노출 농도(1.78 - 6 mg/L)에서 F5 세대 이후 전수 치사하는 것으로 나타났다. 생산력(*fecundity*) 인자에서는 F1 세대에서부터 영향이 나타나기 시작했으며 세대가 지나갈수록 악영향이 축적되는 양상을 보였다. 이는 나노물질에 노출된 물벼룩은 생존을 위하여 충분한 에너지가 생식기능으로 공급되지 못하였기 때문이라고 설명하였다. Völker et al.¹⁸⁾은 *D. magna* 뿐만 아니라 *Daphnia pulex* 그리고 *Daphnia galeata*를 추가하여 총 3종의 물벼룩을 이용하여 AgNPs에 지속적 노출 및 2세대 노출 후 물벼룩의 생존률 및 생식능을 F4 세대까지 후세대 영향 평가를 진행하였다. 최고실험농도(10 µg Ag/L)에 노출된 *D. galeata*를 제외한 모든 실험에서 생존률은 대조군과 큰 차이가 없었으나, *D. magna*의 생식능은 노출된 모든 세대에서 감소하는 영향이 발견되었다. AgNPs에 급성노출된 *D. magna*, *D. Pulex* 및 *D. galeata*의 EC₅₀는 각각 121, 8.95 그리고 13.9 µg Ag/L로 나타났으며, 만성노출시 생식독성 EC₁₀은 각각 0.92, 2.25 그리고 3.45 µg Ag/L로 나타났다. 이는 독성에 저항하기 위한 에너지 비축량을 소모하여 생식기능에 문제가 생긴 것으로 추측되

었는데, Jacobasch et al.¹⁷⁾의 연구결과와도 일맥상통하는 부분이다. 또한 F3 그리고 F4 두 세대 동안 회복기간을 가졌을 경우 생식능이 완전히 회복되지 못하는 것으로 보아 AgNPs로 생긴 후세대 영향은 물벼룩 내에 완전히 사라지지 못하고 수 세대 동안 잔존하는 것을 확인하였다. 반면 *D. pulex*와 *D. galeata*의 생식능은 뚜렷한 감소추세를 확인하기는 어려웠으며 이는 Metallothionein-like proteins (MLTP) 원인의 중금속 저항성 때문으로 보인다. Bundschuh et al.¹⁹⁾은 TiO₂NPs를 *D. magna*에 우수식 노출을 한 뒤 태어난 후세대에서 급성 독성평가를 진행하여 후세대의 독성민감도를 평가하였다. 이전 세대에서 나노물질에 노출된 경험이 있는 후세대에서는 96 h-EC50 값이 대조군에 비하여 4.39 mg/L가 감소하여 이전 세대에 TiO₂ NPs에 노출 경험이 없는 개체보다 더 민감한 것으로 나타났다.

두 번째로 많은 후세대 영향 연구가 진행된 시험종은 *C. elegans*로 총 3건의 연구가 진행되었다. *C. elegans*는 짧은 생활사와 다양한 매체에서 실험이 가능하다는 점 때문에 생태독성 분야에 다양하게 사용되는 시험종이다. Contreras et al.은 두 종류의 나노물질을 *C. elegans*에 F3 세대까지 지속노출 후 수명, 생식능, 성장률 그리고 운동능을 평가하였다. 첫 번째로 다양한 지름(2, 5 그리고 10 nm)을 가지는 AgNPs²⁰⁾를 이용하여 후세대 영향을 관찰하고 비교 분석한 결과, 작은 지름의 AgNPs에 노출될수록 생식률의 감소가 눈에 띄게 나타났다. 이는 작은 나노입자일 경우 전체 표면적이 증가하고, 응집현상이 일어나기 때문으로 보이며, 발달 저해, 기형 그리고 offspring 사망을 일으켰기 때문으로 보인다. 다음으로 다양한 코팅제에 따른 QDs 독성의 차이를 확인하기 위해, CdSe/ZnS core-shell QDs, CdSe core QDs²²⁾ 그리고 카드뮴 염(CdSO₄)을 이용하여 후세대 영향을 관찰하고 비교하였다. 실험결과 카드뮴 염의 형태로 노출 되었을 때, 대부분의 인자에서 확연히 차이를 보였다. Core-shell QDs의 경우 카드뮴 염이나 core QDs에 비하여 모든 인자에서 미약하거나 영향이 없는 것으로 나타났으며 독성영향의 크기 순서대로 CdSO₄ > Core QDs > Core-shell QDs로 측정되었다. 이 때문에 저농도의 core-shell QDs의 경우 세대를 거친 나노물질의 추적에 사용가능 할 것이라고 제안하고 있다. Kim et al.²¹⁾은 AuNPs에 어미세대 노출된 *C. elegans*를 F4까지 생존률, 생식능, 생식기관이상 그리고 산화스트레스를 F4 세대까지 측정하여 후세대 영향을 평가 하였다. F0에 AuNPs에 노출된 선충은 F2를 제외한 모든 세대에서 생식능 이상이 발견되지 않았으나, F2 세대에서 유일하게 모든 노출농도(5 × 10¹⁰ - 50 × 10¹⁰ particles/mL)에서 확연한 생식률 감소가 나타났다. 이는 F0 세대의 오염된 생식기관에서는 비정상적인 생식세포를 지닌 F1 세대가 태어나게 되며 이러한 F1 세대로부터 비정상적인 F2 세대가 태어나게 되었다고 설명하고 있다.

이외 실험종으로 진행된 후세대 영향 연구들을 살펴보면, Panacek et al.²⁹⁾은 초파리(*D. melanogaster*)에 AgNPs를 지속적, 어미세대 노출하여 F8까지 생식률 평가를 진행하였다.

실험 결과 AgNPs에 노출된 초파리의 생식능이 F2부터 F4 세대까지 감소하는 것으로 나타났다. 반면 지속적인 반복 노출에도 불구하고 F4 세대 이후의 노출 그룹에서 생식능이 회복되는 것을 확인할 수 있었으며, F7 세대부터는 대조군과 동일한 수준의 생식능을 지니는 것으로 나타났다. 어미세대 노출 실험을 추가적으로 진행하여 비교해 본 결과 영향이 나타난 세대 이후의 빠르게 회복되는 것으로 보아 AgNPs로 인해 나타나는 부작용은 유전적으로 전달되는 영향은 아닌 것으로 예측되었다. Wang et al.²³⁾은 F0 세대에서 세리아(CeO₂NPs)를 필터페이퍼(filter paper) 노출한 노출군과 그렇지 않은 군으로 나누고 다시 F1 세대에서 각각 노출 여부에 따라 총 4개의 그룹으로 나뉜 토마토(*S. lycopersicum*)의 생체량을 측정하여 후세대 영향을 평가하였다. 실험결과, 세리아 나노물질 노출 첫 세대(F0)에서는 생체량이 증가하지만 노출 후 깨끗한 배지에서 한 세대가 지나게 되면 대조군과 동일한 수준으로 돌아오며, 두 세대 연속으로 노출하게 된 경우에는 생체량이 감소하는 것으로 나타났다. 토마토의 뿌리에 세리아 나노물질이 노출 되었을 경우, 뿌리의 세포막에는 이상이 없었으며 정확한 기작은 밝혀지지 않았지만 식물의 양분 저장기능에 영향을 주어 뿌리의 성장이 더 필요했을 것으로 설명하였다. 또한, 지속적 노출에 따른 뿌리길이의 감소는 세리아 나노물질이 세포분열과 배축(embryonic axis)의 성장을 저해하였기 때문이라고 설명하였다. Geisler-Lee et al.²⁴⁾ 또한 식물의 일종인 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)를 이용하여 AgNPs의 후세대 영향 평가를 F3 세대까지 진행하였다. 이 연구는 나노물질의 다세대 영향을 연구한 논문 중 유일하게 토양 매체에서 진행되었는데, 각 세대 별 노출 이후 작물에서 수확된 씨앗을 이용하여 최종적으로 Filter paper 상에서 발아 실험을 진행하였다 그 결과, F1, F2 그리고 F3의 개체 모두 노출군에서 발아율이 대조군 대비 약 70% 수준으로 감소하였음을 확

인하였다. 마지막으로 Blickley et al.²⁷⁾은 유일하게 해수 시험종인 송사리과 어류(*Fundulus heteroclitus*)를 사용하여 수정란의 건강성에 QDs가 어떠한 영향을 미치는지 연구를 진행하였다. 저농도(0.5 µg/food disc) 그리고 고농도(5 µg/food disc)의 QDs를 포함하고 있는 알약형의 먹이를 제작한 뒤 하루 약 2알 정도를 노출한 개체에서 생산된 수정란을 이용하여 건강성 평가가 진행되었다. 측정 인자는 미발달 수정란, 기형 그리고 부화불능의 수정란의 비율을 계수하여 평가하였다. 더 높은 농도의 QDs 처리군에서는 낮은 농도의 QDs 처리군에 비하여 낮은 수준의 수정란 이상이 발견되었고, 대조군 대비 노출군의 부화율을 비교하면 오히려 더 높은 수준의 부화율이 확인되었다. 이는 QDs에 의해 수정란 이상이 낮은 것으로 추정되긴 하지만, QDs 노출군에서 생산된 embryo의 양이 현저히 적었기 때문에 부화율이 증가한 것이 건강성의 증대를 의미하는 것은 아니라고 설명하였다.

기존 연구들에서는 나노물질로 인해 발생한 후세대 영향을 확인하였고, 평가 수단으로는 독성평가에 이용되는 일반적인 종말점이 이용되었다. 또한, 나노물질로 인한 생존율, 생식률의 감소, 신경독성 및 성장 제한을 확인할 수 있었다. 그러나 후세대 영향을 관찰하기 위한 농도 및 실험 조건에서 세대 간 물질전이 및 독성 기작에 대한 심층 연구가 용이하지 않기 때문에, 후세대 영향의 대상 기관 및 전이 경로 등 자세한 메커니즘에 대한 심층적 연구는 아직 진행되지 않고 있다.

2.2. 나노물질의 세대전이와 측정법

나노물질의 후세대 전이 연구는 2009년부터 2015년까지 총 7건의 연구가 조사되었으며(Table 2), 사용된 나노물질로는 CNPs, Fluorescent nanodiamond(FND), AgNPs, Graphite nanoplatelets(GNP), Quantum dots(QDs) 그리고 Silica NPs

Table 2. Studies of trans-generation using various biota exposed to nanomaterials

| Year | Test species | Materials | Exposure concentration | Exposure type | Generation | Transfer | | Instrument analyses | Reference |
|------|-------------------------------|-------------------|---|---------------|------------|-------------------|--------|--|-----------|
| | | | | | | F0 | F1 | | |
| 2014 | <i>Caenorhabditis elegans</i> | Silica NPs | 2,5 mg/mL | Uptake | F1 | Vulva | Embryo | Confocal laser scanning microscope | 36) |
| 2013 | <i>Caenorhabditis elegans</i> | FND ^{a)} | 3 mg/mL | Injection | F1 | Gonad | Embryo | FLIM ^{d)} , Confocal fluorescence microscopy | 35) |
| 2012 | <i>Caenorhabditis elegans</i> | GNP ^{b)} | 50, 100, 250 µg/mL | Uptake | F1 | Intestine | Embryo | FTIR ^{e)} | 35) |
| 2011 | <i>Caenorhabditis elegans</i> | QDs ^{c)} | 20, 200 nM | Uptake | F1 | Intestine | Embryo | µ-XANES ^{f)} , µ-SRXRF mapping ^{g)} | 34) |
| 2010 | <i>Caenorhabditis elegans</i> | AgNPs | PVPS : 50 mg/L PVPL : 104.17 mg/L CIT10 : 54 mg/L | Uptake | F1 | Intestine | Embryo | HIS ^{h)} | 33) |
| 2010 | <i>Caenorhabditis elegans</i> | FND ^{a)} | 0,5 mg/mL | Injection | F1 | Gonad | Embryo | Fluorescence microscopy | 31) |
| 2009 | <i>Oryza sativa</i> | Carbon NPs | 20, 40, 80, 400, 800 mg/L | Liquid | F1 | Steam, root, leaf | Leaf | FTIR ^{d)} , SEM ⁱ⁾ , TEM ^{j)} | 30) |

^{a)}Fluorescent nanodiamond, ^{b)}Graphitenanoplatelets, ^{c)}Quantumdots, ^{d)}Fluorescence lifetime imaging microscopy, ^{e)}Fourier transform infrared spectroscopy, ^{f)}microbeam X-ray absorbance near edge structure, ^{g)}Microbeam synchrotron radiation X-ray fluorescence mapping, ^{h)}CytoViva-Hyperspectral imaging system, ⁱ⁾Scanning electron microscopy, ^{j)}Transmission electron microscopy

등이 사용되었으며, 모든 연구에서 F0세대에 노출 후 F1 세대까지의 나노물질 전이를 확인하는 연구가 진행되었다. 2009년 Lin et al.³⁰⁾은 벼(*Oryza sativa*)에 Carbon NPs (C₇₀) 또는 MWCNT를 어미세대에 노출하고 얻어진 종자를 받아 시켜 각 기관(뿌리, 줄기, 잎)을 푸리에변환 적외분광분석 (Fourier transform infrared spectrometry, FTIR) 그리고 Transmission electron microscopy (TEM) 촬영을 진행 하였다. 이 연구는 F1 세대의 세포(잎) 내부에 존재하는 탄소를 촬영하였으며, F0세대 내부(씨앗, 뿌리, 줄기, 잎)의 나노물질 거동도 확인한 첫 연구가 되었다. 이 연구를 시작으로 이후 현재까지 진행된 6건의 연구는 모두 *C. elegans*를 이용하여 후세대 전이를 증명하였다.

*C. elegans*는 신체가 투명하여 실체현미경 및 형광분석으로도 내부 나노물질을 확인 가능한 이점이 있으며, 생태독성 분야에 널리 사용되고 있는 시험종이며, *C. elegans*를 대상으로 다양한 기기 분석방법이 수립되어 있다는 장점이 있다. Mohan et al.³¹⁾은 FND를 생식샘(gonad)에 주사하여 생식기관의 발달에 따라 이동되는 과정을 형광현미경을 통해 이미징하였다. 생식샘에 주사된 FND는 난모세포를 지나 수정란으로까지 전달되며 체내 밖으로 나온 수정란에서도 FND의 존재가 확인되었다. 이와 비슷한 연구로, Kuo et al.³²⁾은 FND를 장내 세포(intestinal cell) 혹은 생식샘에 주사하여 난모세포를 지나 수정란까지 전달되는 과정을 공초점 현미경(Confocal fluorescence microscopy 및 형광수명이미징 기법(Fluorescence lifetime imaging microscopy, FLIM)을 이용하여 촬영한 뒤 이미지화 시키는 방법으로 나노물질의 거동을 확인하였다.

위 연구와는 다르게 *C. elegans*의 세포에 직접 주사하지 않아도 장을 거쳐 생식기관에까지 전이가 되었음을 확인한 연구도 있었다. Meyer et al.³³⁾은 Polyvinylpyrrolidone (PVP),

Citrate (CIT) 코팅이 되어있는 AgNPs을 *C. elegans*에 노출시킨 뒤 코팅제에 따른 AgNPs 독성과(F0) 수정란(F1)으로의 전이를 초분광영상장치(CytoViva-Hyperspectral imaging system, HIS)를 사용하여 확인하였다. 이와 유사하게 Qu et al.³⁴⁾은 Microbeam X-ray absorbance near edge structure (μ -XANES), Microbeam synchrotron radiation X-ray fluorescence mapping (μ -SRXRF mapping) 그리고 형광이미징과 성분분석을 통해 *C. elegans* 내부의 나노물질의 시간적 흐름에 따른 이동경로를 확인하였다. 또한, Zanni et al.³⁵⁾은 수정란 내부에 위치하는 GNP를 FTIR 분석을 통해 확인하여 후세대 전이를 확인하였다.

일반적인 나노물질의 섭취 및 전달경로와는 달리 생태계에서 세대전이가 가능한 시나리오로써, *C. elegans*의 외음부를 통하여 직접 생식기관으로 침투를 확인한 연구가 있으며, Scharf et al.³⁶⁾은 Silica NPs 에 노출된 개체를 CLSM을 이용하여 외음부 내부와 정낭에 위치한 Silica NPs를 확인하는 기법을 제안하였다. 지금까지 본 연구에서 언급된 후세대 전이 연구를 토대로 세대전이가 되기까지의 *C. elegans* 내부의 나노물질 거동을 도식화하여 Fig. 1으로 제시하였다.

3. 나노물질 다세대 연구의 제한점 및 향후 연구 방향

나노물질을 이용한 다세대 연구는 2009년부터 2015년까지 20건의 연구가 조사되었고, 발표된 나노물질의 다세대 연구의 수는 매년 증가하는 추세이다(Fig. 2). 집계된 연구는 나노물질에 의해 발현된 후세대 영향에 대한 연구와 다음 세대로의 나노물질의 전이를 확인한 연구로 나눌 수 있으

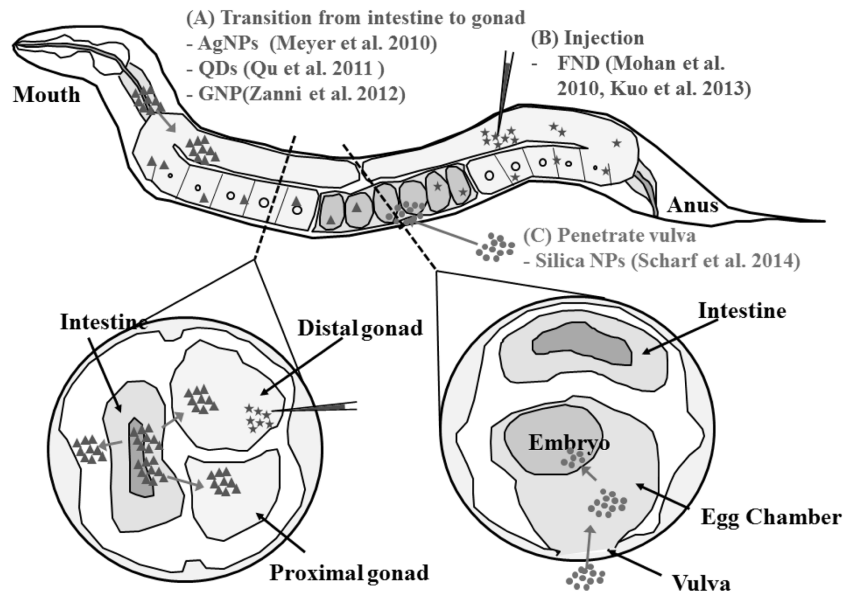


Fig 1. Schematic expression for the fate of nanoparticles in hermaphrodite *C. elegans* embryos via three types of pathway that were reported in the previous studies.³¹⁻³⁶⁾

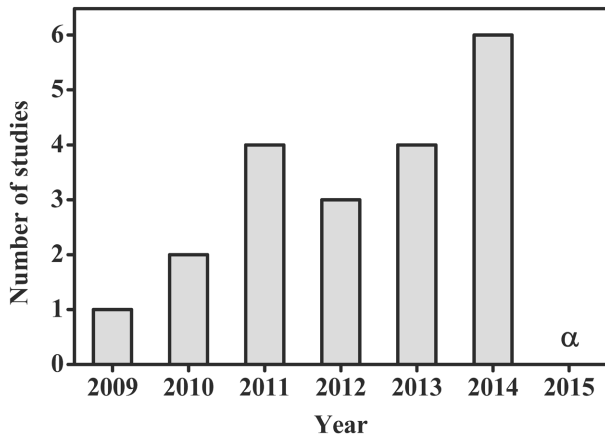


Fig 2. Studies about multi-generational researches using nano-materials

며 다양한 나노물질과 시험종을 대상으로 연구범위가 넓어지고 있는 추세이다. 나노물질의 후세대 영향연구는 2011년에 시작되어 다양한 실험 종과 나노물질을 사용하여 연구가 진행되고 있다. 그러나, 나노물질의 세대간 전이 경로, 거동 및 메커니즘에 대한 연구는 제한적이다. 나노물질의 후세대 영향을 연구한 13건의 연구 중 단 6건의 연구^{16,20,21,23,25,29}에서만 나노물질의 예측거동이나 메커니즘에 대한 언급이 있었으며, 세대전이 연구의 특성상 나노물질의 거동 및 메커니즘에 대한 사실을 밝혀낸 연구는 아직 진행되지 않은 것으로 보인다. 그러나 나노안전성 평가를 위해 후세대 영향을 발현하는 대상 기관과 메커니즘을 밝혀 내기 위해서는 나노물질의 세대간 전이 경로와 거동에 대한 연구도 동시에 진행되어야 할 것으로 사료된다. 또한 실제 환경노출이 일어나는 농도 수준에서의 연구가 진행될 필요가 있다. 후세대 전이 연구는 2009년에 시작되어, 다세대 연구에 비교적 용이한 시험종인 *C. elegans*의 연구가 전체 연구 7건 중 6건을 차지하며, 이를 중심으로 연구가 진행되고 있다. 나노물질의 예상 노출 경로와 물질의 특성에 따라 다른 분석방법들이 존재하며 본문에 제시된 기법들을 이용하여 나노물질의 거동과 세대전이를 확인 할 수 있었다. 그러나 실험간 후세대 전이를 확인하기 위해 나노물질의 직접 주입^{31,32}과 같은 극단적인 노출 방법을 적용한 경우도 존재하였다.

나노물질의 다세대 연구는 다양한 물질로 진행되고 있으며 수생태계를 비롯하여, 토양 생태계, 육상생태계 등 다양한 생태계 서식종으로 실험이 진행되었다. 그러나 독성 종 말점으로 이용한 후세대 영향을 확인한 연구까지만 진행되었으며 그 영향의 원인 및 독성기작을 확인한 연구는 아직까지 없는 실정이다. 이를 보완하기 위해서는 후세대 영향 뿐만 아니라 세대전이 연구에서의 미량원소의 정량적 측정 및 형광 나노물질을 이용한 이미징 기법을 기반으로 하여 나노물질의 생체 내 거동 및 표적세포(target cell) 그리고 세대 간 전이과정에 대한 연구도 동시에 이루어져야 할 것으로 판단된다.

Acknowledgement

This research was supported by the Basic Science Research Program of the National Research Foundation of Korea (NRF), which is funded by the Ministry of Science, ICT, and Future Planning (2014R1A2A1A11050513, 2016R1A2B3010445) and the Ministry of Education (2013R1A1A2061386).

KSEE

References

1. Nel, A., Xia, T., Mädler, L. and Li, N., "Toxic potential of materials at the nanolevel," *Science*, **311**(5761), 622~627 (2006).
2. Kempa, T. J., Day, R. W., Kim, S.-K., Park, H.-G. and Lieber, C. M., "Semiconductor nanowires: a platform for exploring limits and concepts for nano-enabled solar cells," *Energy. Environ. Sci.*, **6**(3), 719~733(2013).
3. Nohynek, G. J. and Dufour, E. K., "Nano-sized cosmetic formulations or solid nanoparticles in sunscreens: a risk to human health?," *Arch. Toxicol.*, **86**(7), 1063~1075(2012).
4. Siow, K. S., "Mechanical properties of nano-silver joints as die attach materials," *J. Alloys. Compd.*, **514**, 6~19(2012).
5. Kesharwani, P., Jain, K. and Jain, N. K., "Dendrimer as nanocarrier for drug delivery," *Prog. Polym. Sci.*, **39**(2), 268~307(2014).
6. Mauter, M. S. and Elimelech, M., "Environmental applications of carbon-based nanomaterials," *Environ. Sci. Technol.*, **42**(16), 5843~5859(2008).
7. O'connell, M. J., "Carbon nanotubes: properties and applications," CRC press(2006).
8. Mochalin, V. N., Shenderova, O., Ho, D. and Gogotsi, Y., "The properties and applications of nanodiamonds," *Nat. Nanotechnol.*, **7**(1), 11~23(2012).
9. Nowack, B., Krug, H. F. and Height, M., "120 years of nano-silver history: implications for policy makers," *Environ. Sci. Technol.*, **45**(4), 1177~1183(2011).
10. Weir, A., Westerhoff, P., Fabricius, L., Hristovski, K. and von Goetz, N., "Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products," *Environ. Sci. Technol.*, **46**(4), 2242~2250(2012).
11. Zhu, X., Radovic-Moreno, A. F., Wu, J., Langer, R. and Shi, J., "Nanomedicine in the management of microbial infection-Overview and perspectives," *Nano Today*, **9**(4), 478~498(2014).
12. Michalet, X., Pinaud, F. F., Bentolila, L. A., Tsay, J. M., Doose, S., Li, J. J., Sundaresan, G., Wu, A. M., Gambhir, S. S. and Weiss, S., "Quantum dots for live cells, *in vivo* imaging, and diagnostics," *Science*, **307**(5709), 538~544(2005).
13. Kim, T.-H., Cho, K.-S., Lee, E. K., Lee, S. J., Chae, J., Kim, J. W., Kim, D. H., Kwon, J.-Y., Amaratunga, G. and Lee, S. Y., "Full-colour quantum dot displays fabricated by transfer printing," *Nat. Photonics*, **5**(3), 176~182(2011).
14. Batley, G. E., Kirby, J. K. and McLaughlin, M. J., "Fate and

- risks of nanomaterials in aquatic and terrestrial environments," *Acc. Chem. Res.*, **46**(3), 854-862(2012).
15. Bergamaschi, E., Poland, C., Canu, I. G. and Prina-Mello, A., "The role of biological monitoring in nano-safety," *Nano Today*, **10**(3), 274-277(2015).
 16. Arndt, D. A., Chen, J., Moua, M. and Klaper, R. D., "Multigeneration impacts on *Daphnia magna* of carbon nanomaterials with differing core structures and functionalizations," *Environ. Toxicol. Chem.*, **33**(3), 541-547(2014).
 17. Jacobasch, C., Völker, C., Giebner, S., Völker, J., Alsenz, H., Potouridis, T., Heidenreich, H., Kayser, G., Oehlmann, J. and Oetken, M., "Long-term effects of nanoscaled titanium dioxide on the cladoceran *Daphnia magna* over six generations," *Environ. Pollut.*, **186**, 180-186(2014).
 18. Völker, C., Boedicker, C., Daubenthaler, J., Oetken, M. and Oehlmann, J., "Comparative toxicity assessment of nano-silver on three *Daphnia* species in acute, chronic and multi-generation experiments," *PloS One*, **8**(10), e75026(2013).
 19. Bundschuh, M., Seitz, F., Rosenfeldt, R. R. and Schulz, R., "Titanium dioxide nanoparticles increase sensitivity in the next generation of the water flea *Daphnia magna*," *PloS One*, **7**(11), e 48956(2012).
 20. Contreras, E. Q., Puppala, H. L., Escalera, G., Zhong, W. and Colvin, V. L., "Size-dependent impacts of silver nanoparticles on the lifespan, fertility, growth, and locomotion of *Caenorhabditis elegans*," *Environ. Toxicol. Chem.*, **33**(12), 2716-2723(2014).
 21. Kim, S. W., Kwak, J. I. and An, Y.-J., "Multigenerational Study of Gold Nanoparticles in *Caenorhabditis elegans*: Transgenerational Effect of Maternal Exposure," *Environ. Sci. Technol.*, **47**(10), 5393-5399(2013).
 22. Contreras, E. Q., Cho, M., Zhu, H., Puppala, H. L., Escalera, G., Zhong, W. and Colvin, V. L., "Toxicity of quantum dots and cadmium salt to *Caenorhabditis elegans* after multi-generational exposure," *Environ. Sci. Technol.*, **47**(2), 1148-1154(2013).
 23. Wang, Q., Ebbs, S. D., Chen, Y. and Ma, X., "Trans-generational impact of cerium oxide nanoparticles on tomato plants," *Metallomics*, **5**(6), 753-759(2013).
 24. Geisler-Lee, J., Brooks, M., Gerfen, J. R., Wang, Q., Fotis, C., Sparer, A., Ma, X., Berg, R. H. and Geisler, M., "Reproductive toxicity and life history study of silver nanoparticle effect, uptake and transport in *Arabidopsis thaliana*," *Nanomater.*, **4**(2), 301-318(2014).
 25. Kumar, A., Pandey, A. K., Singh, S. S., Shanker, R. and Dhawan, A., "A flow cytometric method to assess nanoparticle uptake in bacteria," *Cytometry A*, **79**(9), 707-712(2011).
 26. Kumar, A., Pandey, A. K., Singh, S. S., Shanker, R. and Dhawan, A., "Cellular uptake and mutagenic potential of metal oxide nanoparticles in bacterial cells," *Chemosphere*, **83**(8), 1124-1132(2011).
 27. Blickley, T. M., Matson, C. W., Vreeland, W. N., Rittschof, D., Di Giulio, R. T. and McClellan-Green, P. D., "Dietary CdSe/ZnS quantum dot exposure in estuarine fish: Bioavailability, oxidative stress responses, reproduction, and maternal transfer," *Aquat. Toxicol.*, **148**, 27-39(2014).
 28. Skoog, K., "Cell division in *Escherichia coli*," Department of Biochemistry and Biophysics, Stockholm University, 61(2011).
 29. Panacek, A., Pucek, R., Safarova, D., Dittrich, M., Richtrova, J., Benickova, K., Zboril, R. and Kvitek, L., "Acute and chronic toxicity effects of silver nanoparticles (NPs) on *Drosophila melanogaster*," *Environ. Sci. Technol.*, **45**(11), 4974-4979(2011).
 30. Lin, S., Reppert, J., Hu, Q., Hudson, J. S., Reid, M. L., Rantnikova, T. A., Rao, A. M., Luo, H. and Ke, P. C., "Uptake, translocation, and transmission of carbon nanomaterials in rice plants," *Small*, **5**(10), 1128-1132(2009).
 31. Mohan, N., Chen, C.-S., Hsieh, H.-H., Wu, Y.-C. and Chang, H.-C., "In vivo imaging and toxicity assessments of fluorescent nanodiamonds in *Caenorhabditis elegans*," *Nano lett.*, **10**(9), 3692-3699(2010).
 32. Kuo, Y., Hsu, T.-Y., Wu, Y.-C. and Chang, H.-C., "Fluorescent nanodiamond as a probe for the intercellular transport of proteins in vivo," *Biomaterials*, **34**(33), 8352-8360(2013).
 33. Meyer, J. N., Lord, C. A., Yang, X. Y., Turner, E. A., Baidreddy, A. R., Marinakos, S. M., Chilkoti, A., Wiesner, M. R. and Auffan, M., "Intracellular uptake and associated toxicity of silver nanoparticles in *Caenorhabditis elegans*," *Aquat. Toxicol.*, **100**(2), 140-150(2010).
 34. Qu, Y., Li, W., Zhou, Y., Liu, X., Zhang, L., Wang, L., Li, Y.-F., Iida, A., Tang, Z. and Zhao, Y., "Full assessment of fate and physiological behavior of quantum dots utilizing *Caenorhabditis elegans* as a model organism," *Nano lett.*, **11**(8), 3174-3183(2011).
 35. Zanni, E., De Bellis, G., Bracciale, M. P., Broggi, A., Santarelli, M. L., Sarto, M. S., Palleschi, C. and Uccelletti, D., "Graphite nanoplatelets and *Caenorhabditis elegans*: insights from an in vivo model," *Nano Lett.*, **12**(6), 2740-2744(2012).
 36. Scharf, A., Piechulek, A., von Mikecz, A., "Effect of nanoparticles on the biochemical and behavioral aging phenotype of the nematode *Caenorhabditis elegans*," *ACS nano*, **7**(12), 10695-10703(2013).