비강내 점적 노출을 통한 산화 알루미늄 나노입자의 폐독성 평가

권정택^{*} · 서균백 · 이이미 · 김현미[‡] · 심일섭 · 조은혜 · 김필제 · 최경희

국립환경과학원 환경건강연구부

Pulmonary Toxicity Assessment of Aluminum Oxide Nanoparticles via Nasal Instillation Exposure

Jung-Taek Kwon^{*}, Gyun-Baek Seo, Mimi Lee, and Hyun-Mi Kim[‡],
Ilseob Shim, Eunhye Jo, Pilje Kim, and Kyunghee Choi

Environmental Health Research Department, National Institute of Environmental Research, Incheon 404-708,
Republic of Korea

ABSTRACT

Objective: The use of nanoparticle products is expected to present a potential harmful effect on consumers. Also, the lack of information regarding inhaled nanoparticles may pose a serious problem. In this study, we addressed this issue by studying pulmonary toxicity after nasal instillation of Al-NPs in SD rats.

Methods: The animals were exposed to Al-NPs at 1 mg/kg body weight (low dose), 20 mg/kg body weight (medium dose) and 40 mg/kg body weight (high dose). To determine pulmonary toxicity, bronchoalveolar lavage (ts.AnBAL) fluid analysis and histopathological examination were conducted in rats. In addition, cell viability was investigated at 24 hours after the treatment with Al-NPs.

Results: BAL fluid analysis showed that total cells (TC) count and total protein (TP) concentrations increased significantly in all treatment groups, approximately two to three times. Also, lactate dehydrogenase (LDH) and cytokines such as TNF-alpha and IL-6 dose-dependently increased following nasal instillation of Al-NPs. However, polymorphonuclear leukocytes (PMNs) levels showed no significant changes in a dose dependant manner in BAL fluid. In the cytotoxicity analysis, the treatment of Al-NPs significantly and dose-dependently induced cell viability loss (20 to 30%) and damage of cell membrane (5 to 10%) in rat normal lung epithelial cells (L2).

Conclusions: Our results suggest that inhaled Al-NPs in the lungs may be removed quickly by alveolar macrophages with minimal inflammatory reaction, but Al-NPs have the potential to affect lung permeability. Therefore, extensive toxicity evaluations of Al-NPs are required prior to their practical application as consumer products.

Key words: aluminum oxide nanoparticles, bronchoalveolar lavage fluid, pulmonary toxicity

I. 서 론

나노입자는 그 크기가 직경 100 nm 이하이며 나

노크기의 수준에서 본래의 물리, 화학적 성질과는 다른 특성을 가진다.¹⁾ 이러한 고유 성질로 인하여 나노물질은 최근 다양한 산업분야에서 사용되고 있으

^{*}Corresponding author: Environmental Health Research Department, National Institute of Environmental Research, Incheon 404-708, Korea, Tel: +82-32-560-7177, Fax: +82-32-568-2037, E-mail: inhtox@gmail.com

[‡]Corresponding author: Environmental Health Research Department, National Institute of Environmental Research, Incheon 404-708, Republic of Korea, Tel: +82-32-560-7180, Fax: +82-32-568-2037, E-mail: hmiKim@korea.kr

Received: 3 December 2012, Revised: 7 January 2013, Accepted: 30 January 2013

며 높은 생산성 및 경제성을 창출하였다.²⁾ 특히 전자 산업과 의약품 산업에서 제조 나노물질의 적용은 기존의 물리적 한계를 극복할 수 있는 최첨단 기술로 각광받고 있다.³⁾

최근 OECD에서 우선연구대상 물질로 선정된 14종의 제조 나노물질은 fullerenes(C60), single-walled carbon nanotubes(SWCNTs), multi-walled carbon nanotubes(MWCNTs), carbon black, aluminium oxide, silver nanoparticles, iron nanoparticles, titanium dioxide, cerium oxide, zinc oxide, silicon dioxide, polystyrene, dendrimers, nanoclays이며 이중 금속 나노입자가 6종으로 가장 큰 비중을 차지하고 있다.⁴⁾

국내 나노물질 사용량은 금속성 및 실리카 계열의 산화 나노입자가 많이 사용되며 그 크기는 10~100 nm 인 것으로 조사되었다.⁵⁾ 특히 금속 나노물질인 aluminium oxide nanoparticles(Al-NPs) 및 titanium dioxide nanoparticles 사용량 증가는 의약품 정제와 식품의 안정제로 사용과 함께 크림, 액체의 용고 방지제와 같은 화장품의 원료 물질로서 사용이 가장 큰 요인이다.⁶⁾

나노물질의 사용량 증가는 필연적으로 그에 대한 안전성 확보가 요구되며 특히 의약품이나 화장품과 같이 인체에 직접적으로 사용되는 제품인 경우 더욱더 엄격한 안전성 평가가 요구된다. 이에 따라 국내 외적으로 제조 나노물질에 대한 독성 및 위해성평가가 활발하게 진행되어 가고 있는 상황이다.⁷⁻⁹⁾

최근 들어 국내에서 그 사용량이 급격히 증가하고 있는 Al-NPs의 독성평가결과 폐세포,¹⁰⁾ 면역세포,¹¹⁾ 간세포¹²⁾ 및 뇌세포¹³⁾와 같이 다양한 세포주에서 산화 스트레스, DNA 손상, 세포자살 등과 같은 독성이 보고되었다. 또한 10~40 nm 크기의 Al-NPs를 4주 반복흡입독성을 평가한 결과 폐에서 장기무게 증가 및 염증반응이 확인되었다.¹⁴⁾ 이러한 연구 결과는 Al-NPs를 사용하여 다양한 제품을 생산하는 작업장에서의 근로자와 최종 생산품을 사용하는 소비자 모두가 Al-NPs에 노출될 가능성과 함께 이에 따른 독성 유발 대한 잠재성이 있음을 나타낸다.

그러므로 본 연구의 목적은 Al-NPs 흡입에 의한 잠재적 위험성을 확인하기 위하여 Al-NPs 폐독성 평가를 바탕으로 독성 자료 확보 및 위해성 평가를 위한 기초 자료를 제시하는데 있다.

II. 재료 및 방법

1. 시험물질

본 실험에서 사용한 Al-NPs는 Sigma Aldrich Korea에서 구입하여 사용하였으며 투과전자현미경(Transmission electron microscopy: TEM) 및 입도 분석기(Dynamic Light Scattering: DLS)를 이용하여 실제 크기를 확인하였다.

2. 세포독성 평가

Rats lung epithelial 세포인 L2 세포주를 한국세포주 은행에서 분양 받아 인큐베이터(37°C, 5% CO₂)에서 RPMI 1640 배지로 (10% FBS 및 1% penicillin-streptomycin) 무균 계대 배양하여 사용하였다. 세포 독성을 확인하기 위하여 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 분석, lactate dehydrogenase(LDH) 분석 및 위상차 현미경으로 세포모양 변화를 관찰하였다. Al-NPs 농도를 80, 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25 및 0 µg/ml 설정하여 24시간 처리 후 세포독성을 평가 하였다.

3. 실험동물 및 시험물질 노출

실험동물은 흡입 및 폐독성시험 평가용으로 국·내외에서 널리 사용되는 7주령의 특정병원체 무재(specific pathogen free, SPF) 수컷 SD rats(Orient Bio, Sungnam, Korea)를 1주일간 순화시킨 후 건강하고 발육 양호한 동물을 선별하여 사용하였다. 물과 사료는 자유로이 급식시켰다. 사육조건은 온도 21 ± 3°C, 상대습도 50 ± 20%, 조명 12시간(인공조명, 오전 8시~오후 8시)으로 하였다. 순화기간 중 건강하다고 판정된 동물에 대하여 체중을 측정하고, 평균체중에 가까운 개체를 선택하여 무작위법을 이용, 군 분리를 실시하였으며 각 군의 평균 체중에 대한 군간 차이는 ANOVA 검정으로 통계학적 검증을 실시하여 확인하였다. 동물의 개체식별은 피모색소표시법 및 사육 상자별 tag 표시법을 이용하였다. 노출 군은 대조군, 저농도, 중농도 및 고농도 노출 군으로 군당 bronchoalveolar lavage fluid(BALF) 분석 5마리, 조직병리학적 분석 5마리씩 합계 10마리를 설정하였다. Isoflurane 흡입마취를 통하여 실험동물을 마취 한 후 1 mg/kg body weight(저농도), 20 mg/kg body weight(중농도) 및

Fig. 1. Characterization of aluminum oxide nanoparticles. A: Transmission electron micrograph of aluminum oxide nanoparticles. Scale bar = 50 nm. B: Dynamic light scattering analysis of aluminum oxide nanoparticles size in solution.

40 mg/kg body weight (고농도)의 농도로 실제 흡입노출시 상부호흡기에서 물리적 및 생물학적 방어 기전 활성상황과 유사한 조건을 설정하기 위해 비강 내 점적 노출하였다. 노출 횟수는 격일로 3회 반복 노출하였으며 마지막 노출이 끝나고 2일 후에 50 mg/kg tiletamine plus zolazepam (Zoletil; Virbac, Carros, France)과 15 mg/kg xylazine hydrochloride(Rompun; Bayer, Leuwerkeusen, Germany)을 혼합하여 복강 내 주사하여 안락사 시킨 후 희생부검하였다. 모든 실험동물의 사육 및 실험은 국립환경과학원의 실험동물윤리위원회의 승인을 받은 후 실험동물 관리지침에 따라 실시하였다(NIER-2012-3).

4. 일반증상 관찰, 체중 및 장기무게 측정

일반증상은 모든 실험동물에 대한 상태를 매일 1회 이상 동일한 시간에 관찰하여 일반상태의 변화, 독성증상 발현, 사망동물의 유무 및 시험물질 노출에 의해 발생될 가능성이 있는 증상에 대하여 관찰하였다. 일반적 독성증상 지표로는 피부, 피모상태, 안구, 점막, 호흡기계, 순환계, 신경계, 운동량, 행동양식, 진전, 경련, 타액분비, 설사, 기면, 수면과 혼수상태 등을 관찰하였다. 체중 측정은 시험에 사용된 모든 실험동물에 대하여 시험기간 중 2일 간격으로 측정하였다. 장기무게 측정은 부검 즉시, 뇌, 심장, 폐, 간, 비장, 신장 및 고환의 무게를 측정하였다. 또한 절대 장기무게량 / 부검 직전 체중 $\times$ 100 식을 이용하여 상대 장기무게를 확인하였다.

5. BALF 채취 및 세포분석

기관지에 튜브를 삽입 후 멸균 식염수 5 ml을 주입 및 채취하는 방법으로 5회 반복, 총 25 ml을 채취하였다(채취율 90% 이상). 처음 실시한 5 ml은 원심 분리 후 상등액을 따로 분리하여 Total protein(TP), LDH, TNF- α 및 IL-6를 분석하였다. 5회에 걸쳐 채취한 모든 BALF 세포는 혼합하여 Vi-Cell[®] XR analyzer(Beckman Coulter, Brea, CA, USA)로 총 세포 수(Total cells count: TC)를 측정하였으며 모든 노출 군의 BALF 세포를 2×10^5 /ml 농도로 일치 시킨 후 Shandon Cytospin(Shandon, Pittsburgh, PA, USA)에 100 μ l 주입 및 원심분리를 거쳐 Diff-Quik 염색을 하여 검경하였다.

6. BALF 생화학 및 사이토카인 분석

BALF 내에 TP 농도는 BCA protein 분석법으로 (iNtRON Biotechnology, Seoul, Korea) LDH는 QuantiChrom Lactate Dehydrogenase Kit(BioAssay Systems, Hayward, CA, USA)를 이용하여 분석하였다. TNF- α 및 IL-6와 같은 사이토카인은 ELISA Kit(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 매뉴얼에 따라 분석하였다.

7. 조직병리학적 검사

모든 시험동물은 개체 별로 부검하였으며 이때 육안적 관찰을 동시에 진행하였다. 폐장은 적출 즉시 10% 중성 포르말린(neutral formalin) 용액을 폐장

내로 주입하여 고정하였다. 조직 고정 후 파라핀에 포매를 거쳐 H&E(Hematoxylin and Eosin) 염색 후 검경하였다.

8. 통계학적 분석

각 항목별 분석결과에 대한 통계학적 분석은 one-way analysis of variance(ANOVA) 검정 또는 Student's t-test을 이용하여 $p < 0.05$, $p < 0.01$ 수준에서 실시하였다(Graphpad Software, San Diego, CA, USA).

III. 결 과

1. 세포독성 평가

Al-NPs 노출 후 탐식세포에 제거되어지지 않은 Al-NPs에 의한 폐 상피세포 세포독성 유발 가능성을 확인하기 위하여 L2 세포에서 MTT assay 및 LDH

assay 분석결과 Al-NPs에 24시간 노출 시 농도의존적으로 유의성 있는 세포독성이 관찰되었다(Fig. 2A). 또한 세포모양 변화양상 및 Al-NPs 세포표면 침착 현상도 유사한 결과를 나타내었다(Fig. 2B).

2. 사망동물, 일반증상 관찰, 체중변화 및 장기무게 변화

저농도, 중농도 및 고농도 노출 군에서 시험기간 동안 사망한 동물은 없었으며, 시험물질에 의한 임상증상 또한 관찰되지 않았다. 또한 모든 노출군에서 대조군 대비 유의성 있는 체중변화 및 상대장기 무게의 변화가 관찰되지 않았다(data not shown).

3. BALF 세포 및 생화학지표 분석

Al-NPs 노출에 따른 폐장내 염증유발 가능성을 확인하기 위하여 BALF내 세포 및 생화학 지표를

Fig. 2. Time and dosage-dependent cytotoxicity of aluminum oxide nanoparticles (Al-NPs) in L2 cells. A: Cell viability of aluminum oxide nanoparticles following a 24 hours treatment. Left: Cell viability analysis, Right: Measurement of lactate dehydrogenase level. Mean $\pm$ SEM, * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. control. B: Morphological characterization of L2 cells at 24 hours after exposure of Al-NPs. Cells was examined under inverted microscopy. $\times 200$, Scale Bar = 100 μ m.

Fig. 3. Characteristics of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) cells after intranasal instillation of aluminum oxide nanoparticles. A: Total cells count in BALF. Mean $\pm$ SEM, * p < 0.05 and ** p < 0.01 vs. control. B: Percent of polymorphonuclear leukocytes (PMNs) in total cells from BALF. Mean $\pm$ SEM, * p < 0.05 and ** p < 0.01 vs. control. C: Diff-Quick staining of BALF cell. The arrows indicate PMNs. Arrowheads point to macrophages.

Fig. 4. Biochemical value change in bronchoalveolar lavage fluid (BALF). A: Concentration of total protein. Mean $\pm$ SEM, * p < 0.05 and ** p < 0.01 vs. control. B: lactate dehydrogenase activity. Mean $\pm$ SEM, * p < 0.05 and ** p < 0.01 vs. control.

분석한 결과 농도 의존적으로 대조군 대비 유의성 있는 TC 증가가 관찰되었으나 대부분 대식세포였으며 염증세포인 호중구나 림프구의 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 3). 또한 폐포-모세혈관 투과성 지표인 TP 농도가 전 노출 군에서 통계적으로 유의성 있게 증가 하였으며 세포독성 지표인 LDH 농도 변화는 중농도 군에서만 유의성이 확인되었지만 ($p = 0.032$) 농도 의존적으로 증가하는 양상이 관찰되었다(Fig. 4).

4. BALF 사이토카인 변화

염증 반응에 주요한 지표인 TNF-alpha와 IL-6 사

Fig. 5. Cytokines production in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) after instillation of aluminum oxide nanoparticles. A: Change of TNF-alpha concentration in BALF. B: Level of IL-6 in BALF.

이토카인 변화를 확인한 결과 통계적인 유의성은 없으나 TNF-alpha는 중농도 및 고농도 노출 군에서 대조군 대비 증가하는 경향이 나타났으며 IL-6는 고농도 노출 군에서만 증가하는 양상이 관찰되었다 (Fig. 5).

5. 조직병리학적 변화

폐장에 대한 조직검사결과 고농도 노출 군에서 국소성의 만성 활동성 염증소가 1례 관찰되었으며 혈관주변 또는 기관지 주변에 염증세포침윤 소견이 대조군 및 저농도 노출 군에서 각 1례 관찰되었다(data not shown).

IV. 고 찰

본 연구는 최근 국내에서 사용량이 증가하고 있으나 흡입독성 관련 연구가 부족한 Al-NPs의 폐독성 유발 가능성을 확인하기 위하여 수행되었다. Al-NPs의 비강 내 반복노출에 따른 폐독성을 평가한 결과 BALF내 TC 및 TP 항목이 농도 의존적으로 대조군 대비 통계적으로 유의성 있는 증가가 확인되었다. 이는 Al-NPs 비강 노출에 의해 폐장 내 주요한 면역 반응 중에 하나인 탐식작용의 활성화와 함께 폐포-모세혈관 투과에 영향을 미친 결과로 생각된다.

입자상 물질 흡입에 의한 체내 방어기전은 상부 호흡기내에서 점액섬모운동(mucociliary escalator) 통한 제거와 폐포 내 탐식세포(alveolar macrophage)에 의한 탐식작용으로 크게 나뉜다.¹⁵⁾ 특히 나노물질은 그 물리적 크기로 인하여 흡입 시 폐장 내 깊숙이까지 침투가 가능하다.¹⁶⁾ 본 연구의 시험물질인 Al-NPs는 분말상태에서 개별 크기가 50 nm 이하의 크기를 가지나 입자들이 응집되는 현상이 관찰되었다. 수용성 상태에서 입자크기는 초음파 분산 처리 시 97.2 ± 27.6 nm 크기 분포를 나타내었다(Fig. 1). 이는 비강 내 반복 노출에 따라 상부호흡기를 거쳐 하부호흡기까지 도달할 수 있음을 의미한다. 선행 연구결과에서 형광-자성 나노입자(50 nm)를 마우스 폐포 대식세포에 노출결과 농도의존적으로 나노입자 탐식작용이 활발하였으며 탐식된 나노입자는 세포질 내에는 위치하나 핵 내로는 투과 하지 못하였다. 또한 4주 반복 흡입노출 후에도 폐장에서 유의한 조직병리학적 변화가 관찰되지 않았다.¹⁶⁾ 그러므로 본 연구 결과와 같이 폐장 내에서 대식세포에 의한 탐식작용이 나노입자 흡입에 따른 주요한 체내 방어기전으로 활성화될 가능성이 있는 것으로 생각된다.

BALF내 LDH 및 TP 농도변화는 나노입자 노출에 의한 폐독성 평가에서 중요한 독성지표이다.^{17,18)} 본 연구결과에서 세포막 손상지표인 BALF내 LDH 농도가 대조군 대비 증가하는 양상은 폐장 내에서 대식세포에 탐식되지 못한 채 남아있는 Al-NPs에 의한 것으로 생각되며 이를 확인하기 위하여 랫드 폐상피세포주인 L2 세포에서 LDH assay를 수행하였다. 실험결과 24시간 동안 Al-NPs에 노출될 경우 최고농도인 80 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 의 농도에서 대조군 대비 유의성 있는 세포막 손상이 관찰되었으며 이러한 연구결과

는 사람 폐 상피세포에서 AI-NPs 노출시 농도의존적으로 세포독성을 유발하는 선행연구 결과와 유사하였다.¹⁹⁾ 또한 본 연구에서의 BALF내 LDH 농도 변화 양상이 농도 의존적으로 증가하는 결과와 일치함을 확인 할 수 있었다. 하지만 이러한 독성영향은 다양한 나노물질에 대한 선행 독성연구에서 보고된 것과 같이 세포막 손상 외에도 산화 스트레스, DNA 손상, 세포자살 등과 같은 독성기전에 의해 폐독성이 유발될 가능성이 있다.¹⁰⁻¹³⁾ 그러므로 본 연구에서의 세포독성 결과는 탐식세포에 의한 탐식작용 없이 상피세포만으로 세포막 손상을 확인하였기에 폐장 내에서 탐식되지 않은 AL-NPs가 폐 상피 세포막에 미치는 독성영향으로만 한정하여야 할 것이다.

폐포-모세혈관 투과 영향지표인 BALF내 TP수치는 본 연구에서 가장 유의성 있는 결과이며 대조군 대비 노출 군에서 유의성 있는 증가가 관찰되었다. 이러한 결과는 선행연구 결과인 금속성 은 나노입자 단위 및 반복흡입^{20,21)}에 따른 BALF내 TP 증가양상과 일치하며 금속성 나노입자의 호흡기 노출은 폐 기능에 영향을 미칠 수 있음을 의미한다.²²⁾

TNF-alpha와 IL-6는 폐장 내에서 PMNs와 함께 염증반응을 조절하는 중요한 역할을 하며 다양한 면역반응에 따라 활성화 된다.²³⁾ 본 연구에서 BALF내 TNF-alpha와 IL-6 분석결과 대조군 대비 통계적으로 유의성이 있는 변화는 관찰되어지지 않았다. 하지만 고농도 노출 군에서 TNF-alpha 및 IL-6 수치는 대조군 대비 증가하는 양상이 관찰되었다. 이는 고농도로 노출 시 폐장 내에서 다양한 세포 및 사이토카인의 상호 복합적인 영향을 통해 염증반응을 유발할 수 있음을 나타낸다.

최종적인 폐 조직병리학적 분석에서 확인된 고농도 노출 군에서 국소성의 만성 활동성 염증소 병변(1례)은 정상인 랫드 폐장에서도 종종 관찰된다. 또한 대조군 및 저농도 노출 군에서 관찰되는 염증 세포침윤 소견은 그 정도가 미약하였으며 이러한 병변은 정상 대조 군에서도 종종 관찰되는 병변으로 시험물질에의 노출과는 무관한 것으로 판단된다. 따라서 본 실험의 조직병리학적 결과에서는 AI-NPs 비강 노출에 따른 폐독성은 관찰되지 않은 것으로 사료된다. 하지만 선행연구결과 상피세포와 대식세포의 혼합세포배양 조건에서 AI-NPs 노출시 세포독성은 관찰되지 않았으나 호흡성 병원체(community-

associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: ca-MRSA)에 대한 면역반응이 저하되는 결과가 보고되었다.¹⁹⁾ 비록 본 연구에서 면역능력 변화 평가를 확인하지 못하였지만 본 연구결과와 같이 폐독성 지표의 변화가 미미하더라도 AI-NPs 흡입에 의하여 면역능력이 저하 될 가능성이 존재할 수 있음을 의미한다.

V. 결 론

본 연구를 통해 얻은 결과를 종합해보면 AI-NPs를 비강 내 반복노출 할 경우 폐 상피세포 손상, 대식세포 활성화, 사이토카인 분비등과 같은 일련의 면역반응과 함께 폐포-모세혈관 투과 영향 지표인 TP수치가 증가함을 확인하였다. 이러한 결과는 AI-NPs 흡입은 폐장 내에서 염증반응 유발 및 폐기능이 영향 받을 수 있음을 의미한다. 그러므로 AI-NPs 흡입독성을 정확히 평가하기 위해서는 보다 장기노출 시험과 함께 폐기능 및 면역능력 변화 항목에 대한 추가 실험이 필요하다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2012년도 국립환경과학원 박사후연수과정 지원 사업에 의해 이루어진 것임.

참고문헌

1. Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect.* 2005; 113(7): 823-839.
2. Arora A. Ceramics in nanotech revolution. *Adv Eng Mater.* 2004; 6(4): 244-247.
3. Roco MC. Broader societal issues of nanotechnology. *J Nanopart Res.* 2003; 5(3-4): 181-189.
4. OECD WPMN, "List of manufactured nanomaterials and list of endpoints for phase one of the OECD testing programme", 2008, Paris, France
5. Kim Y, Park J, Kim H, Lee J, Bae E, Lee S, et al. Investigation on the Main Exposure Sources of Nanomaterials for Nanohazards Assessment. *J Environ Toxicol.* 2008; 23(4): 257-265.
6. Uner M, Wissing S, Yener G, Muller R. Influence of surfactants on the physical stability of solid lipid

- nanoparticle (SLN) formulations. *Die Pharmazie-An International J. Pharm Sci.* 2004; 59(4): 331-332.
7. Kwon JT, Kim DS, Minai-Tehrani A, Hwang SK, Chang SH, Lee ES, et al. Inhaled fluorescent magnetic nanoparticles induced extramedullary hematopoiesis in the spleen of mice. *J Occup Health.* 2009; 51(5): 423-431.
 8. Warheit DB, Hoke RA, Finlay C, Donner EM, Reed KL, Sayes CM. Development of a base set of toxicity tests using ultrafine TiO₂ particles as a component of nanoparticle risk management. *Toxicol Lett.* 2007; 171(3): 99-110.
 9. Dreher KL. Health and environmental impact of nanotechnology: toxicological assessment of manufactured nanoparticles. *Toxicol Sci.* 2004; 77(1): 3-5.
 10. Kim IS, Baek M, Choi SJ. Comparative cytotoxicity of Al₂O₃, CeO₂, TiO₂ and ZnO nanoparticles to human lung cells. *J Nanosci Nanotechnol.* 2010; 10(5): 3453-3458.
 11. Wagner AJ, Bleckmann CA, Murdock RC, Schrand AM, Schlager JJ, Hussain SM. Cellular interaction of different forms of aluminum nanoparticles in rat alveolar macrophages. *J Phys Chem B.* 2007; 111(25): 7353-7359.
 12. Hussain S, Hess K, Gearhart J, Geiss K, Schlager J. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *In Vitro Toxicol.* 2005; 19(7): 975-984.
 13. Chen L, Yokel RA, Hennig B, Toborek M. Manufactured aluminum oxide nanoparticles decrease expression of tight junction proteins in brain vasculature. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2008; 3(4): 286-295.
 14. J Pauluhn. Pulmonary toxicity and fate of agglomerated 10 and 40 nm aluminum oxyhydroxides following 4-week inhalation exposure of rats: toxic effects are determined by agglomerated, not primary particle size. *Toxicol Sci.* 2009; 109(1): 152-167.
 15. Green G. Pulmonary clearance of infectious agents. *Annu Rev Med.* 1968; 19: 315-336.
 16. Kwon JT, Hwang SK, Jin H, Kim DS, Minai-Tehrani A, Yoon HJ, et al. Body distribution of inhaled fluorescent magnetic nanoparticles in the mice. *J Occup Health.* 2008; 50(1): 1-6.
 17. Warheit DB, Carakostas MC, Hartsky MA, Hansen JF. Development of a short-term inhalation bioassay to assess pulmonary toxicity of inhaled particles: comparisons of pulmonary responses to carbonyl iron and silica. *Toxicol Appl. Pharmacol.* 1991; 107(2): 350-368.
 18. Warheit DB, Webb TR, Colvin VL, Reed KL, Sayes CM. Pulmonary bioassay studies with nanoscale and fine-quartz particles in rats: toxicity is not dependent upon particle size but on surface characteristics. *Toxicol Sci.* 2007; 95(1): 270-280.
 19. Braydich-Stolle LK, Speshock JL, Castle A, Smith M, Murdock RC, Hussain SM. Nanosized aluminum altered immune function. *ACS nano.* 2010; 4(7): 3661-3670.
 20. Kwon JT, Minai-Tehrani A, Hwang SK, Kim JE, Shin JY, Yu KN, et al. Acute Pulmonary Toxicity and Body Distribution of Inhaled Metallic Silver Nanoparticles. *Toxicol Res.* 2012; 28(1): 25-31.
 21. Sung JH, Ji JH, Park JD, Yoon JU, Kim DS, Jeon KS, et al. Subchronic inhalation toxicity of silver nanoparticles. *Toxicol Sci.* 2009; 108(2): 452-461.
 22. Sung JH, Ji JH, Yoon JU, Kim DS, Song MY, Jeong J, et al. Lung function changes in Sprague-Dawley rats after prolonged inhalation exposure to silver nanoparticles. *Inhal Toxicol.* 2008; 20(6): 567-574.
 23. Thorne PS, McCray PB, Howe TS, O'Neill MA. Early-onset inflammatory responses in vivo to adenoviral vectors in the presence or absence of lipopolysaccharide-induced inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999; 20(6): 1155-1164.