

## 일부 지하수에서 얻은 Aragonite의 특성과 BALB/3T3 세포에 대한 세포독성, 세포분열장애 및 형태학적 변이유발

홍윤철 · 이훈재

인하대학교 의과대학 환경 및 산업의학  
(1996. 2. 10 접수)

## Characteristics of Aragonite From Underwater and The Cytotoxicity, Cell Division Disturbance and Induction of Morphological Transformation on BALB/3T3 Cells

Yun Chul Hong and Hun Jae Lee

*Inha University Medical College, Environmental and Occupational Medicine*

**ABSTRACT:** Aragonite is one of polymorphs of calcium carbonate of which main form is calcite. We found that white precipitate is formed in much amount by boiling underwater of Incheon, Korea and confirmed that it is aragonite. This study is to evaluate the dimensional characteristics, solubility, acid resistance of aragonite and the cytotoxicity, cell division disturbance and cell transforming ability of it on BALB/3T3 cells. The results are as follows: Lengths of the aragonite were reduced to the 72.7% and 22.7% respectively after 5 months and 7 months of intrapleural injection to the Sprague-Dawley rat. Strong acid such as 1M HCl dissolved the aragonite instantly but weaker acid pH 2.0 or more could not dissolved aragonite easily. The result of cell growth inhibition showed that cell numbers were decreased as log-doses of treatment of the aragonite were increased 24 hours, 48 hours, and 72 hours later. Cell plating efficiency after the aragonite treatment also showed dose-dependent decrease. Multinuclear giant cell formation was increased in the aragonite treated cells until ID<sub>50</sub> and after the dose the multinucleate cells were decreased, but remained much higher than negative control cells. Morphological transformation assay showed that the aragonite did not induce transformation in all treated doses.

**Key Words:** aragonite, dimensional characteristics, solubility, cytotoxicity, cell division disturbance, morphological transformation

### 서 론

Aragonite는 Calcite, Aragonite, Vaterite등으로 알려진 Calcium Carbonate의 동질이상체중의 하나로서 끝이 날카로운 침상형을 하고 있는 것이 특징이며 70℃ 이상의 열처리를 하였을 때 수용액에서 Calcium Carbonate가 Aragonite를 형성하는 것으로 알려졌다(Hurlbut *et al.*, 1977). Aragonite의 형성은 Calcium 이온의 농도에 의하여 그 침전생성여부와 생성속도가 결정되고 또 Magnesium등의 양이온 및 음이온의 종류와 양, 유기물의 존재 그리고 기타 이물질등에 의하여 영향을 받는

것으로 알려졌다(Deer *et al.*, 1992). Calcium Carbonate는 지하수내에 정도의 차이는 있으나 어느정도는 항상 있기 때문에 물을 끓였을때 Aragonite가 형성된다면 인체에 대한 폭로원으로서 평가를 하여야 할 것이다. 물론 대부분의 지하수에서 Aragonite가 모두 형성되는 것은 아니지만 칼슘농도가 높은 일부 지하수는 끓였을 경우 Aragonite가 많이 형성될 가능성이 있다. 만일 Aragonite가 지하수를 끓였을때 다량으로 생성되고 또 쉽게 인체에서 용해되지 않는다면 이를 음용하는 사람에게 건강상의 위해를 줄 수도 있을 것이다.

그러나 Aragonite가 건강에 미치는 영향에 대한 연구는 거의

없으며 대부분 신결석이나 담석 등 사람이나 동물에서 stone을 형성하는 물질에 대한 연구일 뿐으로 광물섬유로서 Aragonite가 인체에 미치는 영향을 평가한 연구는 찾아볼 수 없었다 (Saito *et al.*, 1993; Gault *et al.*, 1993; Neumann *et al.*, 1994).

지하수를 가열하였을 때 백색 침전물이 다량으로 생성되며 그것이 Aragonite라는 것이 밝혀졌다. 따라서 본 연구는 일부 지역의 지하수를 가열하였을 때 얻어지는 Aragonite 섬유유 구조적, 물리적, 화학적 특성과 배양세포에 미치는 세포독성, 세포분열장애 및 형태학적 변이유발을 살펴봄으로써 유해성을 평가하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

지하수를 가열하여 끓였을 때 생긴 침전물을 수회 증류수로 씻은 후 건조시켜 백색분말을 얻었다. 이는 위상차현미경에서 섬유상의 물질이었으며 이를 확인하기 위하여 주사전자현미경(SEM)와 에너지분산X선분석(EDX) 및 X선회절분석(XRD)을 시행한 결과 섬유상 물질은 Aragonite이었다.

배양세포에 대한 영향을 보는 실험에서의 음성대조군은 Suspension Solution으로 사용한 Phosphate Buffered Saline (PBS)만을 투여한 군과 Aragonite를 Beadbeater를 이용하여 분쇄하여 섬유상이 없어지고 입자형(Particles)으로 된 것을 사용한 군이었다. 양성대조군으로는 Chrysotile을 사용하였으며 시료는 미국의 UICC Standard Sample(길이 2.5  $\mu\text{m}$ , 직경 0.1  $\mu\text{m}$ )을 이용하였다.

실험에 사용한 배양세포로는 BALB/3T3 Clone A31(ATCC CCL 163, USA)를 사용하였으며 BALB/3T3 세포를 배양하기 위한 배양액은 우혈청(Gibco) 10%와 Dulbecco's Modified Eagle Medium(Gibco)을 섞어서 만들었고 37°C, 10% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다.

### 물리화학적 특성

Aragonite 섬유유의 인체에서의 용해도를 평가하기 위하여 무게가 220 gm 정도되는 20마리의 수컷 Sprague-Dawley Rat의 Intrapleural Space에 투여한 후 5개월, 7개월 및 9개월 후에 각각 4마리씩 살펴보았으며 산에 대한 저항성을 보기 위하여 산도를 다르게 한 HCl 용액에 넣어 용해도를 관찰하였다.

### 세포탐식

60 mm Petri Dish에 Cover Glass를 깔고 그위에 BALB/3T3 세포를 배양시킨 후 Aragonite 섬유유를 투여하여 위상차현미경

및 주사전자현미경으로 관찰하였다. 주사전자현미경으로 보기 전의 전처리로서 세포를 0.1M Phosphate Buffer로 만든 4% Paraformaldehyde-1% Glutaraldehyde Solution으로 고정한 후 1% Osmium Tetroxide로 처리하고 Ethanol과 Isoamylacetate로 단계적으로 건조시켰다.

### 세포증식억제

2  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$ 와 250  $\mu\text{g/ml}$ 의 4개의 농도로 된 Aragonite 섬유유를 BALB/3T3 세포가 80% 정도의 융합도를 이루고 있는 각각 4개씩의 배양플라스크에 1 ml 씩 처리하였다. 그 후 24시간, 48시간, 72시간 후에 각각 Trypsin 처리하여 Hemocytometer로 세포수를 세었다. 세포증식억제는 Suspension Solution만 투여한 음성대조군과 비교하여 세포수 감소 정도로 구하였다.

### 세포배양효율

BALB/3T3 세포에 Aragonite 섬유유를 3일 동안 폭로시킨 후 각 배양플라스크의 세포수를 세고 시험관에서 세포수가 각각 250개/ml가 되도록 세포배양액으로 희석하였다. 각각의 희석액 1 ml를 세포배양액이 2 ml씩 들어있는 4개씩의 60 mm Petri Dish에 넣고 그 후 10% CO<sub>2</sub>, 37°C 배양기에서 10일간 배양시킨 후 Methanol로 고정하고 Giemsa 염색을 하여 집락의 수를 세었다. 집락은 육안으로 식별이 될 수 있는 크기의 집락만을 세고 대조군의 배양효율과 비교하여 백분율로 상대배양효율을 구하였다.

### 다핵세포조사

25 cm<sup>2</sup> flask에서 BALB/3T3 세포에 Aragonite와 분쇄된 입자 및 Chrysotile을 농도별로 2개씩 3일 동안 폭로시킨 후 PBS로 2회 씻고 세포배양액을 5 ml 씩 넣었다. 이후 일주일에 2회 배양액을 갈아주면서 4주 후에 Methanol로 고정하고 Giemsa로 염색하여 한 세포에 3개 이상의 핵을 가진 다핵세포수를 세었다.

### 형태학적 변이 검사

25 cm<sup>2</sup> flask에서 BALB/3T3 세포에 Aragonite 섬유유를 ID<sub>25</sub> (Growth Inhibitory Dose)에서 ID<sub>75</sub>까지 각 농도별로 4개씩 3일 동안 폭로시킨 후 PBS로 2회 씻고 세포배양액을 5 ml 씩 넣었다. 이후 일주일에 2회 배양액을 갈아주면서 4주 후에 Methanol로 고정하고 Giemsa 염색을 하여 변이세포군의 수를 세었다.

면이세포군을 판독하는 기준은 Heidelberg *et al.*(1983)의 방법에 따라서 세포들이 비교적 진하게 염색되고 방향이 제멋대로이며 증충을 이루는 모양을 하고 세포들이 십자형으로 엇갈려 있는 세포군으로 하였다.

자료처리

모든 측정치는 산술평균으로 표시하였고 독성평가의 결과는 대수변환을 하여 선형회귀식을 구한 후 다핵세포형성검사 및 형태학적변이검사를 위한 투여량(ID<sub>25</sub>~ID<sub>75</sub>)을 산출하였다.

결 과

Aragonite의 확인

지하수에서 얻은 광물섬유는 주사전자현미경으로 관찰한 결과 길이 40 μm, 직경 2.5 μm 정도의 섬유상의 결정으로 끝이 뾰족한 침상형을 나타내었다(Fig. 1). 이 광물섬유의 조성을 보기위하여 에너지분산분석을 시행한 결과 CaO 93.0%등으로 Calcium 성분이 대부분을 이루고 있고(Fig. 2) 이를 바탕으로 X선회절분석을 시행한 결과 이 광물섬유는 Calcium Carbonate의 동질이상체인 Aragonite임을 확인하였다.

Aragonite의 물리화학적 특성

Aragonite를 Sprague-Dawley Rat의 Intrapleural Space에 투



Fig. 1. An scanning electron micrograph of aragonite. It shows that the fiber shaped mineral has dimension of 40 μm in length and 2.5 μm in diameter which has sharp ends like a needle. X 500.

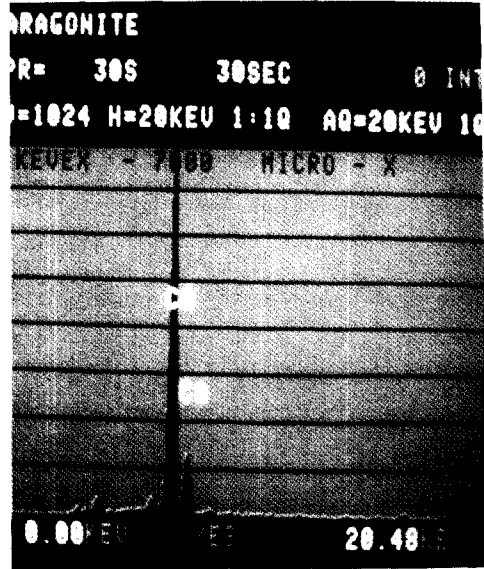


Fig. 2. An energy dispersive X-ray analysis of aragonite (gold coating). It shows that aragonite is composed of calcium dominantly.

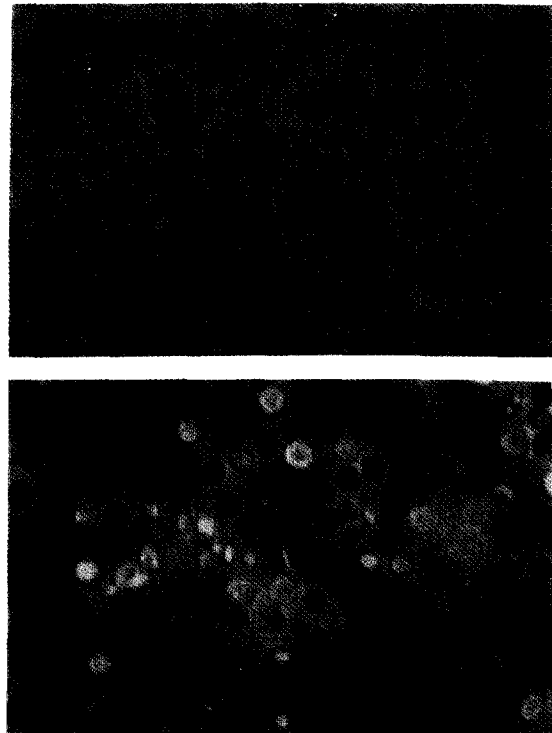


Fig. 3. Inverted photomicrographs of aragonite(arrow) in intrapleural washing solution. Lengths of the aragonite were reduced to 72.7% and 22.7% respectively after 5 months(A) and 7 months(B) of intrapleural injection to the male Sprague-Dawley rats. X 400.



**Fig. 4.** An scanning electron micrograph of a BALB/3T3 cell which is engulfing the aragonite. X 5,000.

여한 후 5개월과 7개월뒤에 washing하여 관찰한 결과 길이가 각각 72.7%와 22.7%정도로 줄어들었으며 섬유상의 형태는 그대로 유지하고 있었지만(Fig. 3) 9개월뒤에는 Aragonite의 섬유상 형태를 거의 찾아볼 수 없었다. 또한 항산성을 평가하기 위하여 HCl 용액에 Aragonite를 투여하고 관찰한 결과 pH 1까지는 매우 쉽게 용해되었으나 pH 2이상에서는 쉽게 용해되지 않는 것을 확인하였다.

#### 세포탐식

배양된 BALB/3T3 세포에 Aragonite를 투여한 후 위상차현미경으로 관찰한 결과 대부분의 Aragonite가 세포주위에 모이는 것이 관찰되었으며 일부는 탐식되는 양상을 나타내었다. 이를 확인하기 위하여 다시 주사전자현미경으로 관찰한 결과 BALB/3T3 세포가 Aragonite를 탐식하고 있다는 것이 확인되었다(Fig. 4). 또한 양성대조군으로 사용한 Chrysotile의 경우도 BALB/3T3 세포의 탐식작용이 뚜렷이 관찰되었다.

#### 세포증식억제

세포가  $4.5 \times 10^4$ 개/ml로 들어있는 flask에 Aragonite를 폭로시킨후 1일, 2일, 3일후에 세포를 관찰한 결과 1일후에는 Aragonite와 Chrysotile에서 폭로량의 대수값에 비례하여 세포수 감소가 있었고 두값이 거의 일치하였으며 이에 비하여 분쇄한 입자에서는 세포수 감소가 현저히 적게 나타났다. 2일후에는 Aragonite의 세포증식억제가 Chrysotile에 비하여 더욱 크게 나타났고 3일후에는 Chrysotile의 세포증식억제가 다소 큰 것

**Table 1.** Number<sup>(1)</sup> of Viable Cells After 1 Day, 2 Days, and 3 Days of Exposure of Aragonite, Milled Aragonite, and Chrysotile  
number of exposed cells :  $4.5 \times 10^4$ /ml

		Dose( $\mu$ g/ml)				
		0	2	10	50	250
Day 1	aragonite	6.7	5.7	4.0	3.4	1.1
	milled aragonite	6.7	7.8	6.7	4.6	4.2
	chrysotile	6.7	5.9	4.1	2.3	1.0
Day 2	aragonite	9.2	7.5	5.6	3.4	2.0
	milled aragonite	9.2	9.4	9.1	5.7	3.8
	chrysotile	9.2	8.8	7.3	4.0	1.5
Day 3	aragonite	11.3	10.6	10.6	5.2	2.8
	milled aragonite	11.3	11.8	12.8	10.3	7.1
	chrysotile	11.3	10.0	9.0	5.8	1.8

(1): mean number of viable cells in 4 flasks( $\times 10^4$ /ml)

으로 나타났으나 전체적으로 보면 분쇄한 입자의 세포증식억제는 현저히 적었고 Aragonite와 Chrysotile은 세포증식억제효과가 거의 유사한 것으로 나타났다(표 1).

#### 배양효율검사

250개의 BALB/3T3 세포를 세어 60 mm Petri dish에서 10일간 배양한 후 아무것도 투여하지 않은 대조군에서는 134개의 집락을 형성하여 53.6%의 배양효율을 나타내었으나 Aragonite를 투여한 결과는 투여량이 증가함에 따라 현저한 배양효율의 감소가 있었다. 양성대조군인 Chrysotile의 경우도 Aragonite와 거의 같은 정도의 배양효율감소가 나타났다. 반면 분쇄한 입자의 경우는 Aragonite나 Chrysotile에 비하여 배양효율감소가 훨씬 덜한 것을 알 수 있었다(Fig. 5).

#### 다핵세포조사

세포분열장애의 정도를 평가하기 위하여 Aragonite를 투여한 후 다핵세포형성(Fig. 6)을 살펴본 결과  $ID_{50}$ 까지는 투여농도가 증가함에 따라 다핵세포수도 많아지고 고농도에서는 다시 다핵세포수가 감소하는 것으로 나타났으나 다핵세포를 세포당 핵수에 따라 분포를 본 결과 투여농도가 증가함에 따라 다핵세포중 세포당 핵수가 많은 세포의 비율이 높아지는 것을 알 수 있었다. 분쇄된 입자의 경우도  $ID_{50}$ 까지는 투여농도가 증가함에 따라 다핵세포수가 많아지는 것으로 나타났으며 그 이상의 투여량에서는 다핵세포수의 상당한 감소가 있었지만 전체적으로는 역시 투여농도가 증가함에 따라 다핵세포중 세포당 핵수가 많은 세포의 비율이 높아지는 것을 알 수 있

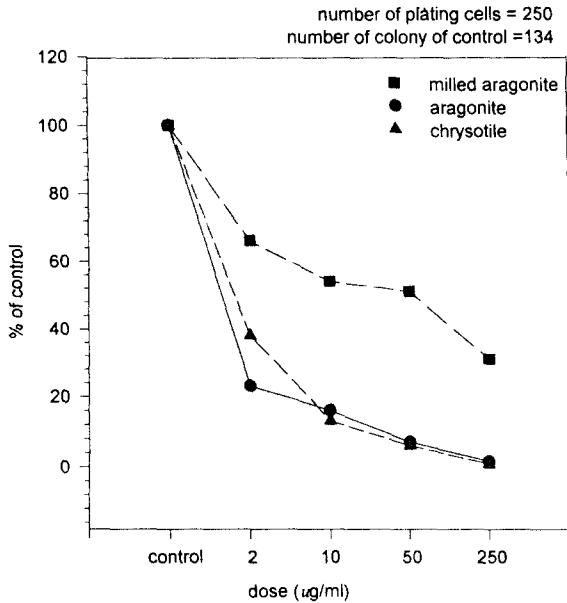


Fig. 5. Relative plating efficiency of aragonite, milled aragonite and chrysotile.

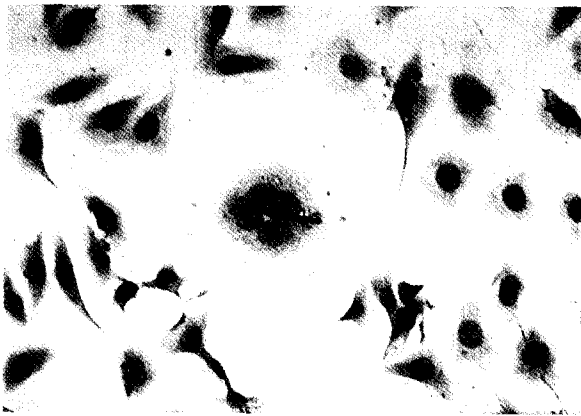


Fig. 6. An inverted photomicrograph of a multinuclear giant cell which has four nuclei. There is an aragonite in the center of the cell. X 400.

었다. Chrysotile의 경우는 Aragonite나 분쇄입자와는 달리 다핵세포의 형성도 적게 나타났고 일정한 경향도 나타나지 않았다(표 2). 다핵세포형성에 대하여 위의 세가지 물질을 비교하여 보면 전체적으로는 Aragonite가 가장 많이 다핵세포를 형성하는 것으로 나타났고 또한 세포당 핵수도 더 많이 나타났다. 분쇄된 입자의 다핵세포형성정도는 Aragonite보다는 적었지만 Chrysotile보다는 큰 것으로 나타났다. 이러한 세군 모두 대조군에 비하여는 훨씬 많은 다핵세포형성작용을 하였다.

Table 2. Multinuclear Cell<sup>(1)</sup> Formation by Aragonite, Milled Aragonite, and Chrysotile

	No. of nuclei/cell				
	3	4	5	6	total
Control	1.0	-	-	-	1.0
<b>Aragonite</b>					
ID <sub>25</sub> <sup>(2)</sup>	4.0	1.0	-	-	5.0
ID <sub>37.5</sub>	12.5	2.5	-	-	15.0
ID <sub>50</sub>	19.0	2.5	1.0	-	22.5
ID <sub>62.5</sub>	16.5	4.0	1.5	-	22.0
ID <sub>75</sub>	5.0	1.5	1.0	0.5	8.0
<b>Milled Aragonite</b>					
ID <sub>25</sub>	5.5	1.0	-	-	6.5
ID <sub>37.5</sub>	10.0	0.5	-	-	10.5
ID <sub>50</sub>	18.0	2.0	-	-	20.0
ID <sub>62.5</sub>	13.0	2.0	0.5	0.5	16.0
ID <sub>75</sub>	5.5	-	-	-	5.5
<b>Chrysotile</b>					
ID <sub>25</sub>	6.0	1.5	-	-	7.5
ID <sub>37.5</sub>	0.8	-	-	-	8.0
ID <sub>50</sub>	6.0	-	0.5	-	6.5
ID <sub>62.5</sub>	4.5	0.5	-	-	5.0
ID <sub>75</sub>	6.5	0.5	-	-	7.0

(1): Multinuclear cell is defined as a giant cell which have more than 2 nuclei 4 weeks later.

(2): Cell growth inhibitory dose

Table 3. Induction of Morphological Transformation by Aragonite, Milled Aragonite, and Chrysotile

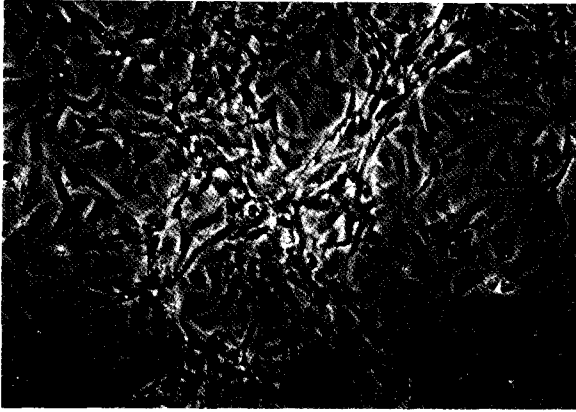
	number of transformed foci <sup>(1)</sup> /flask <sup>(2)</sup>					
	control	ID <sub>25</sub>	ID <sub>37.5</sub>	ID <sub>50</sub>	ID <sub>62.5</sub>	ID <sub>75</sub>
aragonite	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
milled aragonite	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
chrysotile	0.0	0.0	0.8	0.8	1.3	4.0

(1): Transformed foci are dark-stained multilayered cells that are randomly oriented and exhibited crisscross arrays

(2): 16 fields in a 25 T flask were read in the 100× magnification

### 형태학적변이검사

Aragonite를 ID<sub>25</sub>에서 ID<sub>75</sub>까지 투여한 경우 변이세포군을 형성한 것은 대조군과 마찬가지로 한개도 없었다. 분쇄한 입자 역시 ID<sub>25</sub>-ID<sub>75</sub>까지 투여한 경우 변이세포군을 형성하지 않았다. 그러나 Chrysotile의 경우 ID<sub>25</sub>에서는 변이세포군을 형성하지 않았지만 ID<sub>37.5</sub>와 ID<sub>50</sub>에서는 4개의 Flask에서 3개의 변이세포군을 형성하였고 ID<sub>62.5</sub>에서는 4개의 Flask에서 5개, ID



**Fig. 7.** An inverted photomicrograph of a transformed focus by chrysotile where cells are multilayered and randomly oriented and exhibit crisscross arrays. X 400.

75에서는 4개의 Flask에서 16개의 변이세포군을 각각 형성하였다(표 3). 즉 양성대조군으로 사용한 Chrysotile의 경우 투여량 증가에 따라 세포의 형태학적변이(Fig. 7)가 증가하는 양상을 나타내었지만 Aragonite 및 분쇄한 입자 모두 세포변이를 초래하지 않는 것을 알 수 있었다.

## 고 찰

지하수에서 생성이 되는 Aragonite는 수온, 양이온 및 음이온 등의 반응에 의하여 결정이 되는데(Deer *et al.*, 1992) 실험에 사용한 지하수에서 Aragonite의 포화지수(Saturation index =  $\text{Log}([\text{cation}][\text{anion}]/K_{sp})$ )를 구한 결과 -1.32로 불포화상태이기는 하지만 비교적 포화상태에 가깝기 때문에 지하수를 가열하였을 때 Aragonite가 쉽게 형성될 수 있는 조건이라는 것을 알 수 있었다. 또한 생성되는 Aragonite의 길이 및 직경이 항상 일정한 것은 아니며 지하수를 채취한 시점과 장소 그리고 물을 가열하는 온도등에 의하여 차이가 상당히 있는 것을 알 수 있었다. 본 연구에서 사용한 Aragonite는 일부지역의 지하수를 가열하여 얻었으며 에너지분산 X선분석 및 X선회절분석을 시행하여 Calcium Carbonate의 동질이상체인 Aragonite임을 확인하였다.

이러한 Aragonite는 Rat의 Intrapleural Space에서 시간이 지남에 따라 줄어들기는 하지만 7개월 이상의 시간이 소요되는 것으로 나타났다. Aragonite는 지하수를 끓였을 때 생성이 되므로 흡입보다는 음용에 의한 경구섭취가 문제일 수 있기 때문에 위산에 의한 용해작용을 관찰하였는데 산도가 pH 2에서부터는 쉽게 용해되지 않아서 최대 산도가 pH 2인 위산에 저항성이 있을 것으로 생각되었다. 따라서 Aragonite가 형성이

되는 지하수를 끓여서 음용하였을 때 인체에 영향을 미칠 수 있는 폭로원이 될 수 있을 것이다. 본 연구에서는 Aragonite에 의한 인체유해성이 알려진 바 없기 때문에 우선 세포수준에서의 독성 및 변이원성연구를 시행하였다.

세포독성결과를 보면 Aragonite는 Chrysotile의 세포독성과 매우 유사하게 나오고 있었으며 이를 분쇄한 입자를 주었을 경우는 세포독성이 훨씬 감소하고 있어서 Aragonite가 세포독성을 미치는 이유는 화학적인 작용 보다는 주로 구조적인 특성으로 생각되었고 이러한 결과는 세포증식억제결과와 배양효율검사에서 동일하게 나타났다. 더욱이 주사전자현미경상에서 관찰한 결과 Aragonite에 대한 세포의 탐식작용이 매우 활발하게 나타났기 때문에 이로 인한 물리적인 성장장애가 충분히 나타날 것으로 생각되었다.

세포분열장애를 보기위한 검사를 시행한 이유는 물리적인 성장장애가 있다면 세포분열에도 영향을 미칠 것으로 생각되어(Dopp *et al.*, 1995) 세포의 유사분열장애를 평가하고자 하였으며 그 방법으로 다핵세포조사를 시행하였다(Kenne *et al.*, 1986). 다핵세포는 사진에서 보는 것 처럼 Aragonite의 탐식이 유사분열단계에서 핵의 이동을 저해하거나 핵분열이후 세포질의 분열을 저해하기 때문에 형성되는 것으로 생각되었다. 특히 Aragonite의 투여농도가 증가함에 따라 다핵세포중 세포당 핵수가 많은 세포의 비율이 높아지는 것을 알 수 있어 이러한 생각을 뒷받침해주었다. 분쇄한 입자를 투여한 경우에는 세포독성이 적은 데 비하여 다핵세포형성정도는 상대적으로 Aragonite를 투여한 경우와 유사하게 나타났다. 이는 분쇄한 입자가 탐식되면서 세포막에 손상을 주지 않고 유사분열의 저해작용을 하는데 비하여 Aragonite는 크기에 따라 세포막손상을 주어 세포독성이 크게 나타날 수 있었을 것으로 생각되었다. 즉 Aragonite는 길이가 긴 경우 세포탐식후 유사분열장애를 초래하기 이전에 세포막 손상에 의한 세포의 사망으로 갈 수 있으며 길이가 세포안에 완전히 탐식될 수 있을 정도가 되는 경우에만 유사분열장애등 세포의 변화를 초래하는 것으로 생각되었다. Chrysotile의 경우 다핵세포형성이 가장 적게 나타나고 있는데 이는 Chrysotile의 크기가 Aragonite에 비하면 매우 작기 때문인 것으로 생각되었으며 Chrysotile의 세포독성이 크다는 것을 고려한다면 Chrysotile이 세포에 미치는 영향은 Aragonite와는 다른 기전에 의한 것으로 생각되었다. 전체적으로는 Aragonite의 다핵세포형성정도가 가장 크게 나타나서 Aragonite의 구조적 특성이 세포의 성장에 크게 영향을 미치는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 석면 및 인조광물섬유에 의한 세포실험의 결과 섬유유 구조적 특성이 세포독성에 매우 중요한 영향을 미친다는 결과와 일치하는 소견이었다(Stanton *et al.*, 1972; Beck *et al.*, 1972; Hesterberg *et al.*, 1984;

Oshimura *et al.*, 1984; Davis, 1986; Brown *et al.*, 1986).

세포의 형태학적 변이검사는 투여물질이 세포의 성질자체를 변화시키는 표현형의 변화를 보는 방법(Hesterberg *et al.*, 1984; Oshimura *et al.*, 1984; Hong *et al.*, 1994)으로 결과를 보면 Aragonite를 투여한 결과는 전혀 변이세포군을 형성하지 않았고 또 분쇄한 입자의 경우도 변이세포군을 형성한 것은 하나도 없어서 Aragonite는 변이원성이 없는 것으로 나타났다. 반면 Chrysotile은 투여량이 증가함에 따라 변이세포군의 수도 증가하여 변이원성이 있는 것으로 나타났으며 Aragonite와는 세포에 미치는 작용 및 기전이 크게 다르다는 것을 알 수 있었다. 지금까지의 실험실적 세포독성 및 변이원성의 연구를 통하여 Aragonite는 Calcium Carbonate의 동질이상체인 섬유상 결정으로서 구조적 특성에 의한 세포독성 및 세포분열장애를 초래하였으며 형태학적 변이는 초래하지 않는 것으로 나타났다.

## 결 론

Aragonite는 Calcium Carbonate의 동질이상체로서 인천시의 일부 지하수를 끓였을 때 다량 형성되었으며 본 연구는 이러한 Aragonite 섬유상의 구조적, 물리적, 화학적 특성과 배양세포에 미치는 세포독성, 세포분열장애 및 형태학적 변이유발을 살펴봄으로써 유해성을 평가하고자 하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) Aragonite를 Sprague-Dawley Rat의 Intrapleural Space에 투여한 후 5개월과 7개월뒤에 관찰한 결과 길이가 각각 72.7%와 22.7% 정도로 줄어들었으며 9개월뒤에는 섬유상 형태를 거의 관찰할 수 없었다. 항산성을 평가하기 위하여 HCl 용액에 Aragonite를 투여하고 관찰한 결과 pH 1까지는 매우 쉽게 용해되었으나 pH 2 이상에서는 쉽게 용해되지 않았다.

2) 세포증식억제를 보기 위하여 Aragonite에 폭로시킨 후 1일, 2일, 3일 후에 세포를 관찰한 결과 폭로량의 대수값에 비례하여 세포수 감소가 있었다. 세포배양효율에서도 Aragonite를 투여한 군에서 투여량이 증가함에 따라 현저한 배양효율의 감소가 있었다.

3) Aragonite를 투여한 후 다핵세포형성을 살펴본 결과 ID<sub>50</sub>까지는 투여농도가 증가함에 따라 다핵세포수도 많아지고 고농도에서는 다시 다핵세포수가 감소하는 것으로 나타났으나 다핵세포를 세포당 핵수에 따라 분포를 본 결과 투여농도가 증가함에 따라 다핵세포중 세포당 핵수가 많은 세포의 비율이 높아지는 것을 알 수 있었다.

4) Aragonite를 투여한 경우 변이세포군을 형성하지 않았다. 그러나 양성대조군인 Chrysotile의 경우 투여량 증가에 따라 세포의 형태학적 변이가 증가하는 양상을 나타내었다.

이상의 결과에서 Aragonite는 BALB/3T3세포에 대한 세포독성이 크며 세포분열장애를 초래하지만 세포의 형태학적 변이는 유발하지 않는 것으로 나타났다.

## 참고문헌

- Beck E.G, Holt P.F, Manojlovic N, (1972): Comparison of effects on macrophage cultures of glass fibre, glass powder, and chrysotile asbestos, *Brit. J. Industr. Med.* **29**: 280-286.
- Brown G.M, Cowie H, Davis J.M.G, Donaldson K, (1986): *In vitro* assays for detecting carcinogenic mineral fibres: a comparison of two assays and the role of fibre size, *Carcinogenesis* **7**(12): 1971-1974.
- Davis J.M.G, (1986): A review of experimental evidence for the carcinogenicity of man-made vitreous fibers, *Scand J Work Environ Health* **12**(suppl) **1**: 12-17.
- Deer W.A, Howie R.A, Zussman J, (1992): An introduction to the rock-forming minerals, 2nd edition. Longman, Hongkong, 653-658.
- Dopp E, Saedler J, Stopper H, Weiss D.G, Schiffmann D, (1995): Mitotic disturbances and micronucleus induction in Syrian hamster embryo fibroblast cells caused by asbestos fibers, *Environmental Health Perspectives* **103**(3): 268-271.
- Gault M.H, Chafe L, Longerich L, Mason R.A, (1993): Calcium and calcium magnesium carbonate specimens submitted as urinary tract stones. *Journal of Urology.* **149**(2): 244-249.
- Heidelberger C, Freeman A.E, Pienta R.J, Sivak A, Bertram J.S, Casto B.C, Dunkel V.C, Francis M.W, Kakunaga T, Little J.B, Schechtman L.M, (1983): Cell transformation by chemical agents- a review and analysis of the literature. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program: 283-385.
- Hesterberg T.W, Barrett J.C, (1984): Dependence of asbestos- and mineral dust-induced transformation of mammalian cells in culture on fiber dimension, *Cancer Research* **44**: 2170-2180.
- Hong Y.C, Park J.Y, (1994): Uptake, Cytotoxicity and carcinogenicity of Nickel Compounds on BALB/3T3 cells, *Journal of catholic Medical college* **47**(2): 723-737.
- Hurlbut C.S, Klein C, (1977): Manual of mineralogy, 19th edition. John Wiley & Sons, Inc. New York: 303-305.
- Kenne K, Ljungquist S, Ringertz N.R, (1986): Effects of asbestos fibers on cell division, cell survival, and formation of thioguanine-resistant mutants in Chinese hamster ovary cells, *Environmental Research* **39**: 448-464.
- Neumann R.D, Ruby A.L, Ling G.V, Schiffman P, Johnson D.L, (1994): Ultrastructure and mineral composition of urinary calculi from horses, *American Journal of*

- Veterinary Research* **55**(10): 1357-1367.
- Oshimura M, Hesterberg T.W, Tautsui T, Barrett J.C, (1984): Correlation of asbestos-induced cytogenetic effects with cell transformation of Syrian hamster embryo cells in culture, *Cancer Research* **44**: 5017-5022.
- Saito K, Kanno S, Shimada Y, Nakadate K, (1993): Trace metal elements in gallstones and their roles, *Nippon Rinsho-Japanese Journal of Clinical Medicine* **51**(7): 1725-1730.
- Stanton M.F, Wrench C, (1972): Mechanisms of mesothelioma induction with asbestos and fibrous glass, *Journal of the National Cancer Institute* **48**(3): 797-822.