

백서에서 흡인된 티타니아 나노입자의 생체 내 분포에 관한 연구

서울대학교병원 흉부외과학교실,¹ 분당서울대학교병원 흉부외과학교실,² 병리학교실,³
 한국과학기술연구원 Nanomaterials 연구센터,⁴ 청주성모병원 응급의료센터⁵
 최세훈¹ · 박계현² · 전상훈² · 김주현¹ · 정진행³ · 조소혜⁴ · 박종구⁴ · 김태현⁵

Biodistribution of Inhaled Titania (TiO₂) Nanoparticles in Rats

Sehoon Choi, MD,¹ Kay-Hyun Park, MD, PhD,² Sanghoon Jheon, MD, PhD,²
 Joo Hyun Kim, MD, PhD,¹ Jin Haeng Chung, MD, PhD,³ Sohye Cho, PhD,⁴
 Jong-Ku Park, PhD⁴ and Taeheon Kim, MD⁵

¹Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Seoul National University Hospital, Seoul, Korea

²Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery and ³Pathology, Seoul National University Bundang Hospital, Seungnam, Korea

⁴Nano-Materials Research Center, Korea Institute of Science and Technology, Seoul, Korea

⁵Emergency Medical Center, Chungju St. Mary's Hospital, Chungju, Korea

Objectives Titania nanomaterials are widely used as cosmetics and dyes, however the impacts on human health are uncertain. We investigated the biodistribution of inhaled titania nanoparticles in rats.

Methods Eight weeks-old SD rats were intubated and inhaled with 3 mg titania nanoparticles, twice a week, for 2 weeks. After inhalation, the rats were sacrificed and tissues of heart, lung, intestine, brain, and liver were obtained. We investigated the tissues with optical microscope (OM), transmission electron microscope (EM), scanning EM. And to analyze titania concentration of each tissue, we lysed the tissues with radioimmunoprecipitation assay (RIPA) lysis buffer or acid.

Results Granulation tissues in lung were confirmed on the optical microscope, however the other organs had no abnormalities in OM images. In EM images, the rats which inhaled titania nanoparticles showed calcium deposition at heart, brain, and intestine. Titania concentration in lung was increased on the inhaled rat sacrificed 1 month after last exposure.

Conclusion Inhaled titania nanoparticles is thought to be deposited and make inflammatory reaction in lung, and the deposition was not efficiently cleared over a month. However inhaled titania nanoparticles may rarely pass through the alveolus-blood barrier and distribute to other organs of the body.

Korean J Bronchoesophagol 2010;16:33-38

KEY WORDS Titania (Titanium dioxide, TiO₂) · Nanoparticles · Inhalation · Lung · Toxicity.

논문접수일: 2010년 4월 13일 / 심사완료일: 2010년 5월 20일

교신저자: 전상훈, 463-707 경기도 성남시 분당구 구미로 166 서울대학교 의과대학 흉부외과학교실

전화: 031-787-7139 · 전송: 031-787-4050 · E-mail: jheon@snu.ac.kr

서 론

나노물질(nanomaterials)은 단경이 1 nm에서 100 nm인 물질로 정의한다. 입자의 크기가 작아질수록 표면적 대 부피비율이 커지며, 외부로 노출되는 원자 혹은 분자의 비율이 높아짐에 따라, 크기가 큰 입자일 때와 다른 반응성, 독성, 불안정성 등의 물리적 성질을 갖게 된다. 최근 기술의 발달로 다양한 재료의 나노물질이 활발하게 사용되고 있으나, 각각의 나노물질이 환경 및 인체에 미치는 위해성에 대해서는 충분한 연구가 이루어지지 않아, 안정성에 대한 정확한 검증 없이 광범위하게 사용되어 우려스러운 상황이다. 그 중 티타니아(Titania, Titanium dioxide, TiO₂) 나노물질은 물에 잘 녹지 않는 저독성 물질로서, 염료 및 자외선 차단제의 기본 재료로, 각종 코팅제, 윤활제, 화장품 등으로 상업적으로 광범위하게 사용되고 있다.

티타니아 나노물질의 위해성에 관하여 일반적으로, 경구 복용 및 피부 도포 시 큰 위험도의 증가를 보고하지 않았으나, 폐 흡인 시의 염증반응 및 발암성과 DNA 손상 가능성에 대해서는 우려가 되고 있다.¹⁻³⁾ 사람을 대상으로 한 티타니아 독성 연구는 주로 티타니아를 취급하는 작업장의 근로자를 대상으로 한 역학연구로 시행되었는데, 대부분의 연구에서 노출 정도와 암 발생률의 연관관계를 증명할 수 없었으나, 폐 흡인 시 염증 반응이 증가한다는 사실과, 티타니아 증기에 의한 단체 급성 중독의 사례가 보고되는 등 안정성에 대한 의문이 제기되었다.⁴⁻⁶⁾ 또한 반복적인 흡인에 의하여 티타니아 나노물질이 호흡기 상피세포에 축적되어 폐 청소율을 떨어뜨리고, 이는 염증 반응의 증가와 활성산소의 증가, 세포 손상, 섬유화로 이어지는 일련의 과정을 통하여, 세포돌연변이 및 궁극적으로 발암성을 높여가게 되는 결과를 유발한다는 연구를 토대로, 2006년 International Agency for Research on Cancer(IARC)에서 티타니아 입자를 2B군의 발암물질, 즉 인간에게 암을 유발할 가능성이 있는 물질로 규정하였다.¹⁾

티타니아 흡인의 위해성에 대한 기존의 동물실험은 주로 입자 크기, 구조, 노출 시간 등에 따른 위해도의 차이에 주목한 논문으로,⁷⁻⁹⁾ 흡인 후 생체 분포 여부 및 정도를 보고자 하는 연구는 거의 없었다. 탄소 나노물질, polystyrene 등의 물질이 폐 흡인을 통해 흡수되어 간 혹은 혈류를 따라 전신 순환하였다는 논문 등

을 참고하여,^{10,11)} 만약 이미 광범위하게 사용되고 현재 사용량이 늘어가고 있는 티타니아 나노물질이 신체 다른 장기에 저류될 수 있음을 증명한다면 이는 티타니아 나노물질의 위험성을 새롭게 조명하는 의미가 있을 것이다. 이에 본 연구에서는 기도 흡인을 통한 티타니아 나노 물질의 생체 저류 가능성을 확인하는 동물실험을 계획하였으며, 그 예비실험으로서 본 연구를 진행하였다.

대상 및 방법

실험 대상 및 재료

8주령의 Sprague-Dawley 쥐 9마리(몸무게 230~250 gram)를 각 3마리씩 3군으로 나누었다. 1군은 티타니아 흡인군으로 2주 간, 매주 2차례, 1회에 3 mg의 티타니아 나노물질을 전신마취 하 기도삽관 후 인공호흡기 회로를 통하여 분무하였다. 2군은 대조군으로 티타니아 나노물질을 경구 투여하였으며, 저농도(10 mg titania in 150 cc water)와 고농도(50 mg in 200 cc water)의 음용수에서 2주 이상 노출한 군, 3군은 티타니아 노출이 없는 정상대조군으로 구상하였다.

티타니아 나노물질은 한국과학기술연구원이 공급한 평균 크기 23 nm의 티타니아를 사용하였다.

쥐는 총 4번의 티타니아 노출 혹은 2주 이상의 경구 투여 후, 단기와 장기 결과를 확인하기 위하여 마지막 노출로부터 1일과 1개월 되는 시기에 희생하여 심장, 폐, 뇌, 간, 장을 적출하였다.

수술방법

Xylazine(Bayer AG, Germany) 8 mg/kg와 Ketamine(유한양행, 한국) 20 mg/kg을 복강 내 주사하여 마취를 유도한 후 제물대에 클립을 이용하여 사지를 고정하였다. 이후 16 G gauge 정주 카테터(Braun, Germany)를 이용, 기도삽관을 시행하였으며, 인공호흡기에 연결한 후 인공호흡기를 통한 호흡에 문제없는 것을 확인하였다. 인공호흡기의 흡기 회로에 3-way connector를 연결하였으며, 이를 통하여 1 cc 주사기에 3 mg의 티타니아 나노물질을 연결한 후, 약 1분에 걸쳐 서서히 티타니아 나노물질의 흡인을 유도하였다.

관찰방법

2주간 주 2회, 총 4회 티타니아 나노물질을 흡인시

킨 후, 마지막 노출로부터 1일과 1개월에 쥐를 희생하여, 심장, 폐, 간, 장, 뇌를 적출한 후 중성 포르말린 완충액에 24시간 이상 고정한 후 광학현미경 소견을 관찰하기 위하여 헤마톡실린-에오신 염색과 마쑤-트라이크롬 염색을 시행하였으며, 전자현미경 소견을 관찰하기 위하여 2% 글루타알데히드 인산 버퍼 용액에 고정한 후 냉장 보관하였다. 전자현미경은 한국과학기술연구원 산하 나노물질 연구센터에서 제공하는 투과전자현미경(transmission electron microscope, TEM)과 주사전자현미경(scanning electron microscope, SEM) 및 SEM으로 관찰된 부위의 성분을 확인하기 위하여 Energy Dispersive Spectrometer(EDAX)를 이용하였으며, 각 조직 내 집적도(concentration, ppm)를 조사하기 위하여 65°C RIPA(radioimmunoprecipitation assay) 용해액에 24시간 처리한 후 450 μm 필터를 통과한 산물에 대한 고해상도 TEM(high resolu-

tion TEM) 영상을 얻었다.

본 논문은 분당서울대학교병원 부속 동물실험 위원회(IACUC)의 심의를 통과하였다.

결 과

1) 티타니아 나노물질을 흡입한 쥐의 폐에서 일관되게 염증소견, 섬유화 및 육아 조직을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 폐흡인군의 다른 장기 및 경구복용군과 대조군에서는 특이 소견을 찾을 수 없었다.

2) 주사전자현미경(SEM) 소견에서 티타니아 폐흡인 쥐의 경우 심장에서, 티타니아 경구복용 대조군에서는 뇌와 장에서, 다른 장기에서는 뚜렷하게 보이지 않는, 크기 2 μm 가량의 갈습 침착을 다수 확인할 수 있었으나(Fig. 2), Energy Dispersive Spectrometer를 이용하여 갈습 덩어리 내부의 구성 성분을 분석하

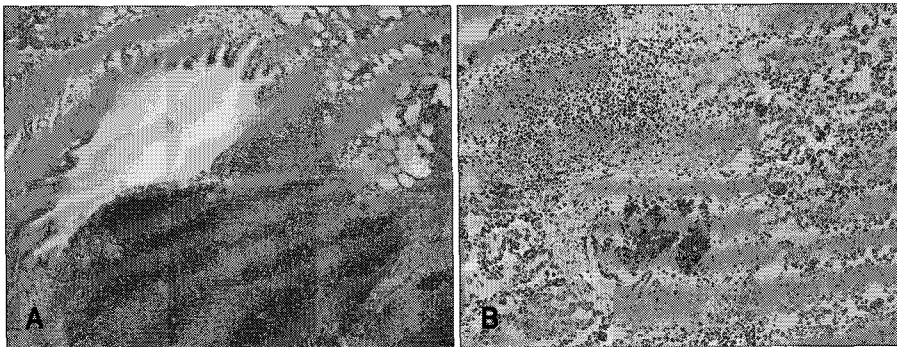


Fig. 1. Lung sections of Titanium inhaled rat. A: Low-power photomicrography (original magnification, 40×; H&E stain) shows mononuclear leukocytes infiltration around a bronchiole and within the alveolar septa. B: Low-power photomicrograph (original magnification, 40×; H&E stain) illustrates homogenous fibrosis, chronic inflammatory infiltrate, and bronchiole filled with mucus containing inflammatory cells and macrophages.

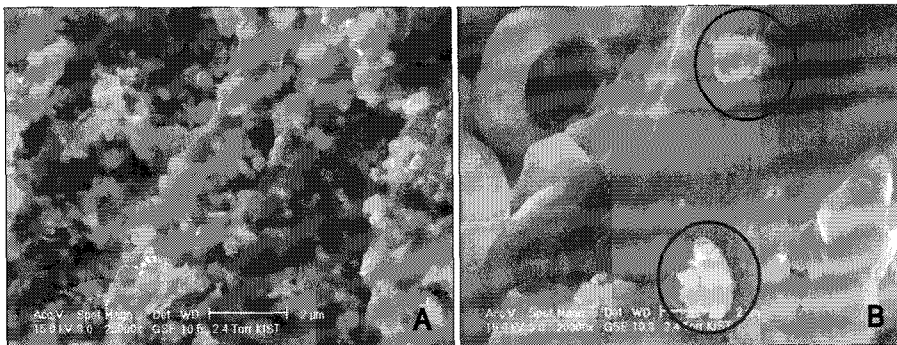


Fig. 2. Scanning electron microscope (SEM) images of the organs. A: SEM image of the lung. It is hard to observe titanium nanoparticle at 25,000× magnification. B: SEM image of brain shows many calcification spots (red round), however titanium nanoparticle was not proved in these lesions, at 20,000× magnification.

Table 1. Titania concentration (ppm) of acid treated mouse sample

Organ	Control	Inhal.	Diet (2 wks)	Diet (4 wks)	Diet (6 wks)
Brain	0.31	1.43	0.90	<1	0.55
Lung	0.64	3.37	0.28		0.42
Liver	1.49	1.01	0.99	0.9	0.58
Heart	1.41	0.54	0.67	1.47	0.25
Intestine	1.87	1.71	11.30	1.06	0.78

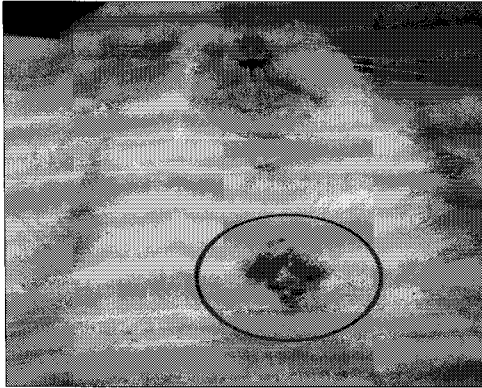


Fig. 3. After 4 times of inhalation of titania nanoparticle, skin defect and tracheal injury was detected. This lesion was not associated with intubational trauma, or physical injury.

였을 때, 티타니아를 확인할 수는 없었다.

3) RIPA lysis buffer와 산을 이용하여 조직을 용해한 후 각 조직에서의 티타니아 농도를 조사하였을 때, 폐 흡인 후 1달이 경과한 쥐의 폐와 경구 복용한 후 1일 지나 장기를 적출한 쥐의 장에서 티타니아 농도가 크게 상승한 것을 확인하였다(Table 1). 폐흡인한 쥐의 다른 장기, 즉 심장, 간, 장, 뇌에서는 티타니아 농도의 증가를 확인할 수 없었다. 경구복용의 경우, 다른 장기 전부와 마지막 노출 후 2주 및 4주 후에 희생하여 관찰한 장에서도 티타니아 농도는 상승되어 있지 않았다. 고해상도 투과전자현미경(HR-TEM)으로 관찰하였을 때, 티타니아 경구복용 쥐의 간에서 크기 20 nm 가량의 입자를 확인할 수 있었다.

4) 티타니아 폐흡인 쥐 1례에서 4회의 티타니아 노출 후, 기도 및 전경부 피부의 괴사가 관찰되었다(Fig. 3).

고 찰

1) 본 실험에 사용된 티타니아 입자는 한국과학기술

연구원에서 자체 제조한 평균 크기 23 nm에 해당하는 물질로, 함수율, 응집성(aggregation)에서 상업적으로 사용 중인 티타니아 파워더(p-25, Degussa)와는 다소 차이가 있다. 흡인된 나노물질이 폐포에까지 도달하기 위해서는 응집성이 낮아야 하는 것이 중요한 요건이며, 특히 습도가 높은 생체 기관 내에서 쉽게 응집되어 큰 응집체를 형성한다면, 말초세기관지 이하까지의 도달이 어려울 수 있다. 하지만, 티타니아 흡인군에서 일관적으로 폐포 주위 염증 소견, 섬유화 및 육아조직의 형성을 보이는 것은 이전의 동물실험과 동일한 결과를 보이는 것으로,^{3,4,7,11)} 본 예비실험에서 사용된 국산 티타니아의 흡인이 적절하게 폐포까지 도달하였음을 의미한다.

2) 주사전자현미경을 이용하여 적출된 조직의 단면에서 티타니아의 침착을 확인하려는 시도는 성공하지 못하였는데, 이의 이유로는 폐흡인 혹은 경구복용을 통하여서는 신체 다른 장기로의 저류가 일어나지 못했을 가능성과, 실제 흡수가 일어났다고 하더라도 그 양이 적어서 무작위로 1회의 절단면을 관찰하는 것으로는 확인하기 어려울 가능성이 있다. 이를 확인하기 위하여, 향후 예정되어 있는 본 실험에서 티타니아 나노물질에 방사성 동위원소 혹은 형광물질을 표지하여, 이를 스캔하는 방법을 고려 중이다. 폐흡인군의 심장과 경구복용군의 뇌, 장에서 다른 장기에서 확인할 수 없었던 2 μm가량의 칼슘 덩어리가 관찰되는 이유에 대해서는 아직 불분명하다. 칼슘 덩어리를 구성하고 있는 성분을 조사하기 위하여 Energy Dispersive Spectrometer를 사용하여 분석하였을 때, 탄소, 산소, 칼슘, 인이 주성분이었으며, 티타니아는 검출되지 않았다.

3) RIPA lysis buffer와 산을 이용하여 조직을 용해한 후 각 조직에서의 티타니아 농도를 조사하는 방법은 기존의 다른 논문과 차별화된 새로운 방법이다. 이를 통하여 폐흡인 후 1개월이 지나 적출한 쥐의 폐에서

와, 경구복용한 후 1일이 지난 쥐의 장에서 고농도의 티타니아가 검출됨을 확인할 수 있었다. 이는 폐 흡인된 티타니아 나노물질의 제거가 완전하게 이루어지지 않음을 의미하며, 오랜 기간에 걸쳐 지속적으로 염증 반응 및 기타 위해한 반응을 유도할 수 있음을 의미한다. 폐 흡인된 나노물질의 대부분이 1, 2일 이내에 객담을 통하여 제거됨을 보고한 기존 논문^{12,13)}과 비교해보아, 매우 중요한 발견이라고 할 수 있다. 반면 경구복용한 쥐의 경우 복용 후 1일 지나 적절한 장에서는 티타니아를 검출할 수 있었으나 2주 및 4주 후 적절한 장에서는 티타니아를 검출할 수 없었던 바, 이는 장에서의 티타니아는 장기간의 침착없이 제거가 효율적으로 이루어짐을 의미한다.

4) 기도 및 전정부 피부의 괴사는 기도 삼관 중의 물리적인 손상이나 다른 쥐와의 신체적인 접촉과는 상관없이 발생한 것으로, 이전 연구에서 보고되지 않았던 특징적인 소견이다. 흡인된 티타니아 나노물질이 점막 및 점액에 의하여 집적되어, 조직 괴사를 유도하였던 것으로 생각되며, 이를 확인하기 위하여 괴사부위의 병리조직검사가 필요하였다.

대조군으로 티타니아 흡인을 시행하지 않은 정상군 이외에 경구복용군을 설정한 이유는 흡인된 티타니아의 제거 기전에 따른 것이다. 흡인된 나노물질은 지방 용해성이 있는 경우 용해를 거쳐 흡수되게 되나, 티타니아와 같이 불용성 물질의 경우 대부분 점액에 의해 집적된 후, 점막섬모운동에 의해 상기도로 올려지며, 이후 소화기관으로 삼켜지거나, 기침 시에 제거된다. 일부 폐포 내에 남아있는 나노물질은 대식세포의 식균 작용과 세포이물흡수(endocytosis)에 의해 제거되며, 극히 일부는 흡인된 나노물질이 폐포의 호흡 주기에 맞추어 caveolae의 개폐(열렸을 때 40~100 nm)에 따라, 혹은 막투과성을 변형하여, alveolar-capillary barrier를 넘어 흡수되는 경로가 보고되었다.¹²⁾ 따라서 폐 흡인군 쥐의 장 적출물에서 티타니아를 발견할 수 있어도 이는 폐에서 흡수된 후 타 장기에 분포하는 것이 아닌, 객담으로 배출된 흡인 티타니아 나노물질이 소화기로 직접 공급된 경우를 배제할 수 없다.

현재까지 나노 물질의 전달, 흡수에 대한 연구는 주로 독성 평가에서 다루어졌지만, 나노기술 및 의학의 접목으로, 나노물질의 폐흡인을 새로운 약의 전달 경로로서 개발하고자 하는 연구가 진행되고 있다. 폐 흡인

의 경우 목표 조직인 폐에 고농도의 약제를 전달하면서, 전신 부작용은 최소화할 수 있기 때문에, 폐렴 혹은 폐결핵의 치료 약제로서의 가능성이 탐구되고 있다.^{12,13)} 전신 부작용을 최소화한 국소 치료로서의 흡인, 작은 나노입자에서 기인한 좋은 세포 침투성, 약제 지속성 및 조절성의 향상, 투약의 간편성 등이 나노흡인치료의 장점으로 언급되고 있으나, 아직 사람을 대상으로 한 나노물질의 위해성에 대한 임상실험은 전무한 실정으로 이의 적용은 짧지 않은 시간이 걸릴 것이다.

흡인된 나노물질의 타 장기로의 분포에 대해서는 현재까지 뚜렷한 결론이 없는 상태이다. 탄소 나노물질의 경우 폐 흡인된 물질이 간에 분포한다는 보고, polystyrene 나노물질이 폐 모세혈관을 통해 전신 순환으로 들어갈 수 있다는 등의 보고가 있었으나,^{10,11)} 결과의 재현성 및 결과 검출 방법에서 논란의 여지가 있는 상태이며, 본 논문에서 다룬 티타니아 나노물질의 경우 폐 흡인 후 타 장기로의 침착에 대한 보고는 없었다. 본 연구에서 역시 폐 이외의 타 장기로의 침착을 확인할 수 없었다.

본 연구의 제한점으로는 티타니아 나노물질은 습기에 예민하여, 다습한 환경에서는 나노물질이 응집(aggregation)되어 큰 집적체를 형성하며, 말초세기관지 및 폐포에까지 도달하는 것에 방해를 받게 된다. 따라서 폐포의 호흡기 상피세포를 통한 흡수 및 타 장기에서의 저류를 확인하고자 하는 연구 결과에 위음성을 초래할 수 있다. 또한 흡인된 티타니아 분말의 정량이 정확하게 이루어지기 어려웠다. 16 gauge 정맥카테터로 기관삽관을 한 후 티타니아 나노분말을 인공호흡기 회로를 통하여 공급하였을 때, 기관 옆으로 새어나오는 양과 호기 회로로 빠져나오는 티타니아 분말을 확인할 수 있었으며, 호기 회로의 끝에 air-trapping bottle를 설치하여 호기 회로로 빠져나오는 티타니아 분말을 정량할 수 있었지만, 기관 옆으로 새어나오는 양은 정량하기 어려웠다.

결 론

티타니아의 폐흡인은 폐에서의 염증 반응, 육아 형성 및 섬유화를 일으키며, 노출 후 1개월이 지나서도 폐에서 제거되지 않을 정도로 장기간 침착이 일어남을 확인할 수 있었다. 경구복용군에서의 티타니아 제거는

효율적이어서 복용을 중지한 후 2주 이상 지난 경우 장 내에서의 티타니아를 검출할 수 없었다. 본 연구에서는 티타니아 나노물질이 폐포-모세혈관막을 침투하여 전신으로 퍼진다는 직접적인 증거를 찾을 수 없었으며, 다른 장기에서 티타니아를 검출할 수 없었다.

Acknowledgments

This study was supported by scientific research grant of the Korea Institute of Science and Technology (KIST), Ministry of Knowledge and Economy (The announcement No. 2007-363, the subject No. 10030811). We gratefully thank Nanomaterials Research Center, KIST for excellent academic suggestions, and technical support.

REFERENCES

- 1) Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, Coglianò V. WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. Carcinogenicity of carbon black, titanium dioxide, and talc. *Lancet Oncol* 2006;7:295-6.
- 2) Singh N, Manshian B, Jenkins GJS, Griffiths SM, Williams PM, Maffei TGG, et al. Nanogenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials* 2009;30:3891-4.
- 3) 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;171:99-110.
- 4) Otani N, Ishimatsu S, Mochizuki T. Acute group poisoning by titanium dioxide: inhalation exposure may cause metal fume fever. *Am J Emerg Med* 2008;26:608-11.
- 5) Liao CM, Chiang YH, Chio CP. Model-based assessment for human inhalation exposure risk to airborne nano/fine titanium dioxide particles. *Sci Total Environ* 2008;407:165-77.
- 6) Liao CM, Chiang YH, Chio CP. Assessing the airborne titanium dioxide nanoparticle-related exposure hazard at workplace. *J Hazard Mater* 2009;162:57-65.
- 7) Kobayashi N, Naya M, Endoh S, Maru J, Yamamoto K, Nakanishi J. Comparative pulmonary toxicity study of nano-TiO₂ particles of different sizes and agglomerations in rats: Different short and long-term post-instillation results. *Toxicology* 2009;264:110-8.
- 8) Warheit DB, Brock WJ, Lee KP, Webb TR, Reed KL. Comparative pulmonary toxicity inhalation and instillation studies with different TiO₂ particle formulations: Impact of surface treatments on particle toxicity. *Toxicol Sci* 2005;88:514-24.
- 9) Warheit DB, Webb TR, Reed KL, Frerichs S, Sayes CM. Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine-TiO₂ particles: Differential responses related to surface properties. *Toxicology* 2007;230:90-104.
- 10) Oberdorster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Lunts A, et al. Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *J Toxicol Environ Health A* 2002;65:1531-43.
- 11) Kato T, Yashiro T, Murata Y, Herbert DC, Oshikawa K, Bando M, et al. Evidence that exogenous substances can be phagocytized by alveolar epithelial cells and transported into blood capillaries. *Cell Tissue Res* 2003;311:47-51.
- 12) Tang W, Peters JJ, Willians III RO. Inhaled nanoparticles-a current review. *Int J Pharm* 2008;356:239-47.
- 13) Lai SK, Wang YY, Hanes J. Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues. *Adv Drug Deliv Rev* 2009;61:158-71.