화재로 인한 HCN 가스에 노출된 마우스의 병리학적 관찰 및 단세포 전기영동법을 사용한 DNA 변성 추적에 관한 연구

†조남욱 · *오은하 · **황성규

한국건설기술연구원 화재안전연구센터, *네오딘의학연구소, **서울과학기술대학교 정밀화학과
(2012년 9월 17일 투고 2012년 12월 17일 수정 2012년 12월 17일 채택)

A Study on DNA Degeneration by Comet Assay & Pathological Observation for Mouse Which were Exposed HCN Gases from Fire

†Nam-Wook Cho · Eun-ha Oh* · Sung-Kwy Hwang**

Fire Disaster Preventionresearch Center, Korea Institute of Construction Technology
(KICT), 182 Nado-ri, Mado-myeon, Hwaseong-si, Gyeonggi-do, 445-861, Korea

*NEODIN Medical Institute, Yong Dab-dong, Sung Dong-gu, 133-170, Korea

**Dept. of Fine Chemistry, Seoul National University of Science and Technology, Seoul
139-743, Korea

(Received September 17, 2012; Revised December 17, 2012; Accepted December 17, 2012)

요 약

화재시 당면할 수 있는 위험성의 여러 인자 가운데 연소 독성 영향은 피난 및 최종 생존에 중요한 영향을 미치고 있다. 화재 독성에 지금까지 대한 대부분의 연구는 치사 측면에 국한되어 왔다. 이에 본 연구에서는 대표적인 질식성 가스인 HCN을 대상으로 가스유해성시험방법(KS F 2271)을 통하여 실험동물(흰쥐)에 직접 독성가스를 흡입시킨 후 평균행동정지시간을 측정하고, 이들 실험동물군의 내부 장기 변화, 혈액학 분석 및 단세포전기영동 분석을 통해 연소 독성가스가 생체에 미치는 영향을 정량적으로 분석하고자 하였으며, 기존 가스유해성시험에서 확인할 수 없었던 집근(병리검사, 혈액검사, 혈액생화학검사, 단세포전기영동분석)을 통해 연소 독성학 분야의 생물학적 위험도를 측정하고자 하였다.

Abstract - Combustion Toxic Effects among several factors of risk encountered during fire are important in the evacuation and final survival, and they are broader and fatal than the direct damages caused by flame. Most studies on fire toxicity until the present are limited to fatality, mainly deaths by fire through pathological research. In this study, it is conducted as a fundamental experiment to address 3 principles of animal experiment and to provide an alternative test to animal testing that is regulated by national building codes and it was conducted through approval by the animal testing ethics committee. Hence, in this study average time of activity stop was measured after directly inhaling toxic gases (HCN) to laboratory animals (mice) through gas toxicity test (KS F 2271) for major asphyxiating gases(HCN) which are produced during fire combustion. effects of Combustion toxic gases on body were quantitatively analyzed through changes in internal organs and hematological analysis, and electrophoresis of a single cell of these laboratory animals. Biological conclusion of combustion toxicology is drawn through approaches (pathological examination, blood test, blood biochemical test, electrophoresis analysis of single cell) which could not confirmed in existing gas toxicity test.

Key words : comet assay, animal test, pathological observation, combustion toxicology

†Corresponding author:nwcho@kict.re.kr

Copyright © 2012 by The Korean Institute of Gas

I. 서 론

1.1. 연구배경 및 목적

화재시 당면할 수 있는 위험성의 여러 인자 중의 연소 독성 영향은 피난 및 최종 생존에 중요한 영향을 미치고 있다. 지금까지 화재 독성에 대한 대부분의 연구는 치사 측면에 국한되어 왔다. 화재 중 사망의 궁극적 원인에 대한 연구는 영국에서 수행된 Strathclyde 연구에서와 같이 화재로 인한 사망에 대한 병리학적 탐구를 통해 이루어졌다[1]. 실험용 동물을 이용한 연소 독성 연구는 주로 치사수준을 측정하기 위해 활용되어 왔으며, 이 때 일산화탄소(CO)나 염화수소(HCl)와 같은 단일 연소 생성물 혹은 개개의 물질로부터 발생한 여러 열분해 생성물의 혼합물에 대해 LD₅₀ 개념이 주로 활용되었다[2].

물질의 치사 독성 효능은 일산화탄소, 시안화수소, 그리고 산성가스(관련 음이온이 해당 물질의 기본 조성 중에서 현저한 부분을 차지하고 있을 경우) 등과 같이 대량으로 발생하는 독성가스에 의해 지배되는 경향이 있다[3]. 화재 중에 발생하는 2가지 주요 질식성 가스는 일산화탄소와 시안화수소이다. 화재의 단계나 관련 물질의 종류와 상관없이 일산화탄소는 정도의 차이는 있지만, 화재 중에 언제나 발생하므로, CO 노출로 인한 질식의 리스크가 거의 예외 없이 어느 정도 존재한다[4]. 질소 함유 물질이 화재에 개입될 경우, 시안화수소는 항상 어느 정도 존재한다. 이에 해당하는 물질로는 아크릴, 폴리우레탄 폼, 멜라민, 나일론, 그리고 모 등이 있으며, 이러한 물질은 대부분의 건축물 화재에서 어느 정도 관여되고 있다. 시안화수소는 대규모 플래시오버 후 단계의 화재에서 고농도로 발견될 가능성이 높다. 화재 희생자 혈액에서 예외 없이 측정되는 카르복시헤모글로빈과 달리 시안화 혈액은 측정되지 않는 경우가 많다. 그러나 일부 화재 희생자의 혈액에서 시안화 혈액이 고농도로 감지된 적도 있다[1].

화재 시 발생하는 독성가스 중 시안화수소가스(HCN)는 어느 특정한 질소 함유물의 불완전 연소 시에 비교적 많은 양이 발생하며 독성의 허용농도는 10 ppm 이다. 청산화합물중 독성이 강하며 그 독성은 시안이온(CN-)이 생체조직의 시토크롬 C 산화효소(Cytochrome C Oxidase)에 영향을 주기 때문에 호흡이 저해된다. 대량 섭취하면 수초 만에 사망하는 독성가스이다[5].

그동안 국내에서 마감 재료에 대한 연소독성 평가는 설치류(마우스)를 이용한 가스유해성시험(KS F2271)을 통해 실험용 쥐의 평균행동정지시간으로 평가되어 왔다(Fig. 1). 가스유해성시험은 대상 시험체의 연소로

부터 발생하는 미지가스를 실험용 쥐에 노출시켜 마우스의 행동시간으로 피난시간을 예측하는 방법이다. 그러나 최근 동물보호법(농림수산식품부) 및 실험동물에 관한 법률(보건복지부)의 개정에 따라 동물실험의 경우 제한적인 범위에서 수행하도록 규정하고 있으며 동물실험윤리위원회를 설치하여 해당 실험을 심의하도록 하고 있다. 또한 동물실험의 윤리적 관점의 3원칙(3R, Replacement, Reduction, Refinement)을 규정하여 시행하고 있다. 첫째 무생물 시스템의 이용 또는 세포 및 조직배양법을 이용한 동물실험을 대체방법을 적극 도입하여야 하고, 둘째 실험결과 얻을 수 있는 유용한 정보의 손실이 없이 이전에 사용되던 동물의 수를 줄이는 방안의 모색, 셋째 동물관리 취급 및 실험절차의 개선을 통한 동물의 고통 통증 및 스트레스 저감 방안 개선을 강력하게 유도하고 있다. 이에 본 연구에서는 화재 연소 시 발생하는 독성 가스 중 HCN 가스를 대상으로 가스유해성시험방법(KS F 2271)을 통하여 실험동물(흰쥐)에 실험 대상물질(HCN)을 흡입시킨 후 평균행동정지시간을 측정하고, 이들 실험동물군의 내부 장기 변화, 혈액학분석 및 단세포전기영동분석을 통해 연소 독성가스가 생체에 미치는 영향을 정량적으로 분석하고자 하였다. 또한 동물실험의 3원칙에 대응

Fig. 1. Gas toxicity experiment and animal cages.

화재로 인한 HCN 가스에 노출된 마우스의 병리학적 관찰 및 단세포 전기영동법을 사용한 DNA 변성 추적에 관한 연구

하기 위한 연구 및 국내 건축법에서 규정하는 동물 실험의 대체시험을 마련하기 위한 기초연구로 진행되었으며 동물실험윤리위원회의 승인을 거쳐 진행하였고 기존 가스유해성시험에서 확인할 수 없었던 접근(병리검사, 혈액검사, 혈액생화학검사, 단세포 전기영동분석)을 통해 연소 독성학 분야의 기초 연구 자료로 활용하고자 하였다.

II. 실험 방법

2.1 KS F 2271 (가스유해성시험)

건축법 제43조, 동 시행령 제61조 및 '건축물의 피난·방화 등의 기준에 관한 규칙' 제24조에서 건축물의 내부 마감재에 대한 용도 및 규모별 적용 대상을 정하고 있으며 이러한 분류기준에 따라 불연, 준불연 및 난연재료의 화재성능을 확보한 재료를 사용하도록 규정하고 있다. 난연 성능 평가방법은 건축물의 피난·방화 등의 기준에 관한 규칙 제5조 내지 7조 규정에 따라 제정된 '건축물 마감 재료의 난연 성능 기준'(국토해양부 고시 제2011-39호)에서 정하고 있으며 국제규격으로서 채택된 콘칼로리미터 방법(KS F ISO 5660-1)과 불연시험방법(KS F ISO 1182) 및 가스유해성시험방법(KS F 2271)을 채택하여 그 성능기준을 Table 1과 같이 정하고 있다.

연소 독성을 평가하기 위한 가스유해성시험(동물시험)은 불연재료, 준불연 재료 및 난연재료의 모든 등급시험에 필수 시험으로 적용되고 있다. 이번 실험에서는 건축마감 재료의 직접 연소를 통한 배출 가스의 mouse 노출방식이 아닌 표준가스를 사용하여 Fig. 2와 같이 상부의 유량조절 장치를 통해 HCN 가스를 직접 주입하였다.

가스유해성 시험 장치에서 시험체의 연소로 발생된 가스는 먼저 가열로 상부의 교반상자로 유입되며 이

후 우측의 피검상자(8마리 mouse가 위치된 상자)로 이동된다. Fig. 2는 본 연구에 사용된 실험장치의 도

Table 1. Flame resisting commodity classification performance criteria

Level	Standard	Criteria for performance
Non-combustible material	KS F ISO 1182 (Construction Performance Test for non-combustible material)	<ul style="list-style-type: none"> During the Test time, 20 minutes, Maximum temperature in the heating furnace should not exceeding final equilibrium temperature about 20 K. (If the measured temperature of material couldn't reach equilibrium temperature for test time, 20 minutes, Final average temperature for 1 minute is acceptable for the final equilibrium temperature.) Mass reduction rate should be less than 30 %
	KS F 2271 (Hazardous Gas test)	<ul style="list-style-type: none"> Average dead stopping time should be more than 9 minutes during experiment.
Quasi-noncombustible material	KS F ISO 5660-1 (Cone Calorimeter test)	<ul style="list-style-type: none"> THR should be less than 8 MJ/m² for 10 minutes of test. And Maximum HRR should be less than 200 KW/m² for 10 seconds during the test. Whole melting of core material or any cracking or hole that penetration to the rear side shall not be observed after the testing time.
	KS F 2271 (Hazardous Gas test)	<ul style="list-style-type: none"> Average dead stopping time should be more than 9 minutes during the test.
Incombustible material	KS F ISO 5660-1 (Cone Calorimeter test)	<ul style="list-style-type: none"> THR should be less than 8 MJ/m² for 5 minutes of test. And Maximum HRR should be less than 200 KW/m² for 10 seconds during the test. Whole melting of core material or any cracking or hole that penetration to the rear side shall not be observed after the testing time.
	KS F 2271 (Hazardous Gas test)	<ul style="list-style-type: none"> Average dead stopping time should be more than 9 minutes during the test.

Table 2. HCN standard gas experimental concentration

Gas	Concentration (ppm)
HCN	10.4 (Low)
	52.1 (Medium)
	140.0 (High)

1. Standard Gas Cylinder
2. Pressure regulator
3. Gas Transfer lines
4. Gas toxicity tester Animal Cages
5. Gas transfer lines
6. Flowmeter

Fig. 2. Experiment illustration.

헤로써 실린더형태의 표준가스로부터 가스유해성 시험장치의 피검 상자로 독성가스를 조절하여 유입하였다. 실제 가스유해성 시험에서 교반상자에서 피검상자로 유입되는 유량은 측정결과 분당 약 23리터이며, 표준가스를 사용한 본 실험에서도 표준가스의 피검상자 유입 유량을 동일하게 23리터로 조절하였다. Table 2는 이번 실험에 사용된 HCN 표준가스 농도이며, 표준 가스는 국내 (주)리가스(표준가스생산 제조사)로부터 공급받아 사용하였다. 표준가스의 농도범위는 FTP Code(Fire Test Procedure, 선박용 화재안전 규격)에서 규정하는 HCN에 대한 기준농도(140 ppm) 및 실제 마감재의 연소에서 발생하여 측정된 농도 값을 참고로 하여 설정하였다[6]. 또한, MSDS에 따르면 TLV-TWA의 허용 농도는 10 ppm(ACGIH)이며 이번 실험농도에 반영하였다.

실험용 흰 쥐의 평균 행동 정지 시간(x)은 다음 식(1)~(3)에 따라 구한다.

$$x = \bar{X} - \sigma \quad \text{식(1)}$$

$\bar{X}$: 8마리 실험용 흰 쥐의 행동 정지 시간

$$\bar{X} = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + x_4 + x_5 + x_6 + x_7 + x_8}{8} \quad \text{식(2)}$$

σ : 8마리 실험용 흰 쥐의 행동 정지 시간의 표준 편차(단위 : 분)

$$\sigma = \sqrt{\frac{(x_1 - \bar{X})^2 + (x_2 - \bar{X})^2 + \dots + (x_7 - \bar{X})^2 + (x_8 - \bar{X})^2}{8}} \quad \text{식(3)}$$

$x_1, x_2, \dots, x_7, x_8$: 실험용 흰 쥐 각각에 대한 행동 정지 시간

2.2. 표준가스를 이용한 mouse의 병리독성 관찰

오염되지 않은 mouse를 대조군으로 분석하고, 표준가스에 노출된 각 농도별 6마리에 대하여 부검하여 Fig. 3과 같이 1차 육안 관찰을 하였으며, 폐, 신장, 간, 심장 및 비장 등의 장기를 적출하여, 10% 중성 포르말린 용액에 고정 보관하고 장기조직 중 폐는 병리조직학적 검사를 하였다. 검체 제작은 조직에 대하여 일정한 두께로 삭정한 다음, 일반적인 조직처리과정을 거쳐 파라핀 포매(Embedding)하고 2~3 μm 두께로 박절하여 조직절편을 제작한 후, H&E (Hematoxylin & Eosin) 염색을 실시하였다. 완성된 조직 검체는 광학현미경(Olympus BX50, Olympus Optical)으로 관찰하였으며, 관찰한 조직에 대하여는

Fig. 3. Viscus excision of laboratory animals.

광학현미경에 부착된 디지털 카메라(Olympus DP70, Olympus Optical)를 이용해 사진 촬영하였다.

2.3. 혈액생화학 분석

혈액생화학 검사는 혈액 중의 화학성분과 기능을 측정하여, 질환의 진단, 치료, 예방을 위한 객관적인 정보를 제공하며, 병태나 병의 원인 해명을 목적으로 하는 검사이다. 본 연구에서 검사한 항목 및 항목에 따른 임상학적 의미는 다음과 같다

TP (total protein)는 순단백질과 비단백태질소화합물의 합이며 혈액속 단백질 함량 적으면 신시구체 질환, 간질환, 기아 등을 나타내며, 많으면 심한 탈수, 골수종, 임파육종을 나타낸다. Albumin은 지방산이나 약물의 수송, 삼투압조절, 칼슘결합 등을 나타낸다. 보통 소화기질환, 신질환, 간질환등이 심할 때 그 수치가 내려간다. TBIL(total bilirubin)는 혈청 빌리루빈의 양을 나타내는 것으로 황달지수를 나타내며, GLU(glucose)가 일시적으로 높아지는 것은 쇼크, 큰 사고 등으로 이어질 수 있다. 가장 흔히 GLU수치가 높으면 당뇨병, 낮으면 저혈당을 나타낸다. 신장(kidney)기능 수치를 나타내는 BUN(blood urea nitrogen), CRTN (creatinine), 간세포 기능 수치를 나타내는 GOT(glutamic oxalacetic transaminase)는 글루탐산 옥살로아세트산 트랜스아미나아제. L-아스파르트산의 아미노기를 α -케토글루타르산으로 전달하여, 옥살로아세트산과 L-글루탐산을 생성하는 가역반응을 촉매하는 효소로 간염, 심근경색 등의 진단시 혈중에서의 이 효소활성에 대한 측정을 나타낸다. GPT(glutamic pyruvic transaminase)는 알라닌의 아미노기를 α -케토글루타르산에 전달하여, 피루브산과 글루탐산 생성반응을 촉매하는 효소이며 간·담도계 질환의 진단을 위해 혈액중의 이 효소의 활성측정을 한다. ALP(alkaline phosphatase)

는 인산가수분해효소로 인산에스테르를 가수분해하는 효소이다. 혈액 중의 이 효소활성은 간이나 뼈 등의 질환에 의해 변화하기 때문에 임상검사의 대상이다. LDH(lactate dehydrogenase)는 유산을 탈수소해서 피루빈산을 만드는 효소고 5종의 아이소자임이 있으며 질환에 따라서 혈청의 아이소자임상대량이 달라지게 되므로 진단에 도움이 되며 LDH는 심근, 골격근, 간, 신장 등에 다양으로 함유되어 급성간염, 간암, 당도암 등의 간질환 외에 급성심근경색, 악성빈혈, 백혈병, 폐암 등에서는 혈청중에서 고활성치를 나타낸다. TCHO(total cholesterol)는 고콜레스테롤혈증 외에 당뇨병, 내분비질환, 간·담도계 질환, 신장질환, 비만 등의 경우에 증가한다. 또한 무β리포단백혈증 등 선천적인 저콜레스테롤혈증을 나타내는 질환이 있으며, 갑상선기능 항진증, 간경변, 만성간염 등에서도 총콜레스테롤은 저하한다. 혈중 Phosphorus는 식이, 호르몬, 신장 등에 영향을 받고, 높으면 호르몬질환, 어린동물, 신부전, 용혈 등을 나타낸다[7].

2.4. 단세포전기영동법 분석

병리독성관찰 및 혈액분석과 함께 실험동물에 대한 단세포전기영동분석(Single Cell gel Electrophoresis, 이하 Comet Assay)를 수행하였다. 인간에게 있어 어떤 화학물질에의 폭로를 감지하고 정량화하는 것은 외부물질에 대한 인간의 생물학적 반응과 화학물질의 특성을 이해하는데 중요한 일이다.[8] 이러한 면에서 독성을 연구하는데 있어서 세포의 DNA 손상을 민감하게 감지해 줄 수 있는 기술들이 유용하게 사용되어져 왔으며 각각의 세포수준에서 DNA 손상을 감지할 수 있는 기술이 독성 영향을 분석하는데 매우 중요하다. 단세포 전기영동법(Single Cell gel Electrophoresis)은 DNA 손상을 정량화할 수 있는 비교적 간편한 방법이어서 유전독성 연구에 많이 적용되고 있다. 이 방법은 분석결과 나타나는 모양이 혜성의 모습과 같아 Comet Assay 라고도 부르며, Micro-gel Electrophoresis Assay 라고도 부른다. 단세포 전기영동법(Comet Assay)은 분자 독성학을 비롯하여 유전자 손상에 관련된 연구에 널리 적용되어지는 방법으로 이후 보다 민감하게 DNA damage를 감지할 수 있는 alkaline 방법으로 발전되었다. 이후 계속적으로 분석법이 발전하였고, OECD Guideline으로 채용되기 위해 Alkaline 분석방법이 수립되었다.

Comet Assay의 원리는 다음과 같다. DNA에 독성 등에 의한 상해가 있는 경우 DNA 염기쌍이 분리되면서 DNA구조가 변형되어 결과적으로 DNA의 구조가 relax되고 염색이 외부로 노출되어 전기

영동 시 양극 쪽으로 이동하여 원래구조로부터 확장된 tail의 형태를 보임으로써 전기영동법에 의해 DNA 손상을 감지할 수 있게 된다. Fig 4와 같이 상해를 받은 세포는 밝은 형광을 나타내는 head 부분과 tail로서 나타나게 되고 Fig 5와 같이 손상을 받지 않은 세포는 완전한 형태로 head만을 보이게 된다.[9] 처리물질에 의한 손상정도는 tail의 길이와 tail의 형광의 강도 즉, DNA양과 관련이 있으며 따라서 DNA양을 측정하는 것이 오히려 손상을 측정하는데 보다 정확한 방법으로 최근에는 DNA content를 포함하는 파라미터로 tail moment를 주로 사용하고 있다[9]. 본 연구에서는 HCN 가스에 노출된 mouse의 혈액 중 백혈구의 하나인 림프구의 전기영동분석 수치를 측정하여 DNA손상을 분석하였다. HCN 가스에 노출된 동물로부터 2 ml의 채혈 후 즉시 림프구를 분리하여 단세포전기영동시험에 사용하였다. 혈액 0.5 ml을 15 ml의 코니칼 튜브(Conical tube)에 옮긴 후, 동량의 PBS 버퍼액으로 희석한 후,

Fig. 4. Comet assay using single cell gel electrophoresis: Normal cells(a) and damage cell (b).

이를 2.0 ml의 Ficoll-Paque를 이용하여 림프구를 분리하고, PBS 버퍼액으로 세정 후 약 $2 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 개가 되도록 희석 또는 농축하였다. 슬라이드에 NMP 아가로스 50 μ l를 도포·말린 후, NMP 아가로스 100 μ l를 도포·건조시킨다. 그리고 림프구 50 μ l와 1 % LMP 아가로스 50 μ l을 섞어 도포하여 건조하고, 0.5 % LMP 아가로스를 도포하고 말린다. pH 10인 용해 완충액에 넣어 1시간 30분 동안 담갔다가 꺼내서 pH 13의 풀림완충액에 20분간 담근다. 슬라이드를 25 V, 300 mA로 20분간 전기영동 후 중성 버퍼액에 세 번 세척한다. 슬라이드는 각 샘플에 대하여 두 개씩 작성하였으며, 에티디움 브로마이드[Ethidium Bromide (EtBr)]로 형광 염색하여 515-560 nm의 필터와 590 nm 필터를 이용하여 형광현미경 하에서 이미지 분석 프로그램(Komet 4.0)을 이용하여 슬라이드 당 50개의 세포로부터 Tail DAN, Tail Extent Moment, Olive Tail Moment 값을 측정하였다.

III. 시험결과 및 고찰

3.1. 가스유해성 시험결과

Table 3은 HCN 가스 10.4 ppm(저농도), 52.1 ppm(중농도), 140.0 ppm(고농도)에 노출된 mouse의 평균 행동정지시간이다. 보통의 경우 건축 재료의 직접 연소에 의한 연기를 mouse에 노출하지만 이번 연구에서는 실제 화재에서 발생할 수 있는 HCN가스 3종을 대상으로 피검상자에 직접 주입하여 측정하였다. 10.4 ppm(저농도)에서는 14분55초로 시험이 종료된 이후에도 8마리의 mouse의 생존을 관찰할 수 있었고, 52.1 ppm(중농도)에서는 13분44초의 평균행동정지시간을 기록하였으며, 140.0 ppm(고농도)에서는 이보다 짧은 8분23초를 보였다. HCN의 농도가 높아지면 행동정지시간이 짧아지는 경향을 보였으나 독성가스에 대한 행동정지시간의 측정은 매우 단순한 관찰에 의한 계산이며, 실제 생체 내에서 발생하는 정량적인 위험을 파악할 수 없는 한계를 가진다[10].

Table 3. Gas toxicity experiment result

Gas	Flow rate (L/min)	Concentration (ppm)	Concentration (ppm)
HCN	22	10.4 (Low)	14.55
		52.1 (Medium)	13.44
		140.0 (High)	8.23

3.2. HCN에 노출된 mouse의 병리학적 관찰

HCN에 노출된 mouse에 대한 병리학적 관찰을 위해 적절한 장기는 심장, 간, 폐, 비장, 신장, 흉선의 6가지 조직 장기(Organ)이다.

흡입 물질에 대한 각각의 조직별 소견은 다음과 같다(Table 4). Fig. 5와 같이, 폐에 대한 조직병리학적

Table 4. Pathological examination result

Organ/ Findings	HCN Dose(ppm)	Mouse			
		10.4	52.1	140	Total
	Number of animals	5	5	5	15
Heart	Mineralization, arterial wall, (+/-)	5	5	5	15
Liver	Central vein, hemorrhage(+), partial vein hemorrhage(+), cell necrosis(+/-)	2	0	0	2
	central vein, hemorrhage(+), portal vein hemorrhage(+), cell necrosis(+)	3	5	5	13
Lung	Mineralization, arterial wall, (+), Large vascular congestion(+), terminal bronchiol(+/-), congenital alveolar hemorrhage(+), septum	5	0	0	5
	Small vascular congestion(+), Large vascular congestion(+), terminal bronchiol(+/-), congenital alveolar hemorrhage(+)	0	5	0	5
	Small vascular congestion(+), Large vascular congestion(+), terminal bronchiol(+/-), congenital alveolar hemorrhage(++)	0	0	5	5
Spleen	Small vascular congestion(+), Giant cell(+), cortex hemorrhage(++), medulla hemorrhage(+)	5	5	5	15
Kidney	Glomeeulus hemorrhage(+), cortex hemorrhage(+), Tubule medulla hemorrhage(++), apoptosis	1	0	0	1
	Glomeeulus hemorrhage(+), cortex hemorrhage(++), Tubule medulla hemorrhage(++), necrosis	0	1	1	2
Thymus	Small vascular congestion(+), Large vascular congestion(+), cortex hemorrhage(+), medulla hemorrhage(+)	5	5	5	15

Fig. 5. Exposed lung tissue in HCN. 200magnification.

Fig. 8. Exposed spleen tissue in HCN. 200magnification.

Fig. 6. Exposed heart tissue in HCN. 200magnification.

Fig. 9. Exposed thymus tissue in HCN. 200magnification.

Fig. 7. Exposed liver tissue in HCN. 200magnification.

검사 결과, 고용량군 및 중용량군에서 기관지 및 폐포강(Bronchiolo-Alveolar)에서 갈색 색소를 가진 대식세포의 존재(Brown Pigment Laden macrophage)가 관찰되었다. 다만, 대식세포가 뚜렷한 집락을 형성하지 않고, 주위조직에서 다른 형태적인 변화를 동반하지 않았기 때문에 이러한 소견은 시험물질의 유입에 따른 생리적인 처리과정중인 것으로 판단되었다

Fig. 6의 심장에 대한 조직병리학적 검사 결과 소혈관 충혈이 주로 발생(low, medium에서는 미약하고 high이상에서 발생됨)되었다. 간에 대한 검사 결과 Central Vein & Portal Space(중혈 & 울혈)은 low~max까지 나타나고 간세포 파괴 & sinusoid(굴모양 혈관)출혈은 high, max조건에서 발생되었다(**Fig. 7**).

비장과 흉선에 대한 검사 결과 소혈관 충혈 & 울혈이 low~max에 전반적으로 미약하게 발생되었다

(Fig. 8~9). 신장에 대한 검사 결과 신사구체, Proximal(몸쪽) & Distal tubule(원심세뇨관)울혈이 low~max까지 발생되었다. 전체적으로 폐와 신장에서 조직에 대한 손상이 심하게 나타났다. 이러한 병리학적 관찰은 세포를 현미경으로 관찰하여 검사하는 방법이며, 본 연구에서는 혈액의 생화학적 검사 및 Comet Assay 등과 병행하여 분석을 시도하였다.

3.3. 혈액 생화학 검사

복대동맥으로부터 채혈된 혈액을 3,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 얻은 혈청을 혈액생화학분석기(TBA 20-FR)를 이용 TP, Albumin, TBIL, GLU, BUN, CRTN, GOT, GPT, ALP, LDH, TCHO, Phosphorus 등의 항목을 측정하였다.

혈액생화학 검사결과(Table 5), 고용량군의 노출군에서 관찰된 GPT와 GOP의 증가는 간질질 세포의 파괴가 진행되고 있음을 암시해 주고 있으며, 조직병리검사에서도 중농도군에서 과립세포 침윤과 다형핵 거대세포의 출현, 그리고 고농도군에서 간세포 섬유화와 담즙색소 침착 등이 관찰되어 시험물질의 폭로에 의한 간 손상을 확인할 수 있었다. 또한 중농도군 및 고농도군에서 관찰된 크레아티닌의

감소는 간혈적이지만 감소한 것으로 보아 시험물질의 폭로에 기인된 변화로 사료된다. 크레아티닌은 대부분 근육 내에 존재하는 내인성 물질로서 신장질환이나 근육질환이 있을 경우 혈중에 증가하게 되며, 간경화증 등 간질환시에는 다소 감소하는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 실험에서 관찰된 크레아티닌의 감소는 시험물질의 폭로에 기인된 간질환 소견과 관련된 것으로 판단된다.

혈액생화학 검사 결과 Glucose, BUN, GPT, LDH, Cholesterol, Phosphorus는 각각 유의성 있게 증가하였다. GOT와 GPT는 대조군의 결과에 비해 통계학적으로 유의하게 약 5.8배와 1.5배 증가한 것으로 나타났다. 중용량군에서는 총단백질과 알부민 및 GLU가 대조군에 비해 각각 통계학적으로 유의성 있게 증가하였고, ALP는 유의성 있게 감소하였다. 각각의 가스 저, 중, 고농도군에서는 GOT, GPT, 콜레스테롤과 LDH 및 CPK가 대조군에 비해 각각 유의성 있게 증가하였다. GOT, GPT, LDH는 대조군의 결과에 비해 상당히 크게 증가한 것으로 나타났다. BUN과 CRTN, T-BIL 및 ALP가 대조군에 비해 각각 통계학적으로 유의성 있게 증가하였다.

각각의 가스 실험의 결과를 볼 때 약간의 편차는

Table 5. Exposed in HCN physiological result of mouse

Parameters	Reference range	Control	Concentration (ppm)		
			10.8	49.4	141
Total protein(g/dL)	5.4 - 7.1	4.95 ± 0.51	5.4 ± 0.84	5.1 ± 0.47	4.9 ± 0.56
Albumin(g/dL)	2.6 - 3.3	4.34 ± 0.18	3.4 ± 0.22	3.2 ± 0.37	3.1 ± 0.30
Bilirubin(mg/dL)	0.4 ± 0.5	0.48 ± 0.04	0.1 ± 0.07	0.1 ± 0.23	0.1 ± 0.05
Glucose(mg/dL)	31.4 - 200	137.40 ± 34.22	221 ± 22.55*	207 ± 14.74*	226 ± 14.14*
BUN(mg/dL)	10 - 28	17.20 ± 1.81	28.19 ± 1.71*	29.28 ± 4.97*	27.12 ± 1.57*
Creatinine(mg/dL)	0.5 - 1.4	0.24 ± 0.00	0.3 ± 0.00	0.3 ± 0.02	0.3 ± 0.01
GPT(U/L)	23 - 66	50.45 ± 4.35	186.77 ± 14.51*	148.55 ± 13.55*	210.79 ± 11.54*
GOT (U/L)	21 - 102	88.2 ± 5.88	67.93 ± 5.14	59.56 ± 6.54	83.54 ± 6.25
ALP(U/L)	20 - 156	138.20 ± 8.50	6.9 ± 1.82***	6.4 ± 2.59***	5.5 ± 0.54***
LDH(U/L)	45 - 233	185.40 ± 11.44	677 ± 15.55*	619 ± 35.75*	560 ± 67.22*
Cholesterol(mg/dL)	28.6 - 11.04	88.60 ± 8.08	126.53 ± 13.16*	125.82 ± 10.69*	108.23 ± 10.76*
Triglyceride(mg/dL)	135.4	89.00 ± 7.10*	97.82 ± 8.85*	107.19 ± 13.24*	92.83 ± 7.23*
Phosphorus(mg/dL)	2.6 - 6.2	5.30 ± 0.61*	10.7 ± 2.09*	10.2 ± 1.81*	8.2 ± 0.71*

All values are expressed as means ± SD.

Significant differences as compared with control: *, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001

있지만 이는 mouse이므로 혈액량이 적어 약간 상반된 결과를 보이기도 하였다. 그러나 대부분의 가스에 노출된 mouse에서는 총단백질과 크레아티닌은 큰 변화를 보이지는 않았다. GPT, GOT, 콜레스테롤 등은 약간의 차이는 있지만 농도 의존적으로 모두 증가하는 경향을 보였다. 이상으로 볼 때 혈중 총단백의 증가(탈수증, 고 γ -globulin, 만성염증질환, 간경변) 또는 감소(단백질섭취부족, 소화흡수장애, 체외상실) 혈중 BUN감소(간부전) T-Bile증가(적혈구 파괴), GPT, GOT 증가(간염심근 경색, 근질환, 용혈성 질환) LDH, ALP증가(적혈구 파괴, 심근경색, 근위축, 간염, 신장경색) 또는 ALP 감소(선천성 hypophosphatasia), GLH감소(단백질 증가), T-Chol증가(신증후, 간질환, 갑상선 기능저하), CPK 감소(갑상선 기능항진, 고 Bililubin 혈증) 또는 증가(근질환, 신경근 질환, 중추신경계질환, 중독, Halothane 마취) 등은 적혈구 파괴, 간, 심장, 신장, 갑상선의 기능 및 기질적 변화가 고농도 폭로군에서 어느 정도 진행되고 있는 것으로 사료된다.

3.4. HCN에 노출된 mouse의 Comet Assay

대조군(Control) 및 HCN 가스 10.4 ppm(저농도), 52.1 ppm(중농도), 140.0 ppm(고농도) 노출군의 혈액 내 림프구를 이용하여 Comet assay를 통해 DNA 손상을 분석하였다. 분석 결과, 대조군과 대비하여 중농도, 고농도 노출군에서 DNA 손상이 나타났고, 통계적으로도 유의하였다(Table 6, Fig. 10). 즉 HCN은 독성이 큰 질식성 가스로서 농도가 높아질수록 노출되는 동물의 DNA 손상에도 매우 큰 영향을 미치는 것으로 확인하였다(Fig. 11-12). Table 2의 가스 유해성시험을 통한 각 농도별 평균행동정지시간에서와 같이, HCN가스의 농도가 높아질수록 Comet Assay분석을 통한 DNA의 파괴정도가 비례함을 분석할 수 있었다. 이러한 결과로 보아 가스 흡입으로

Fig. 10. Exposed in HCN gas lymphocyte DNA damage of mouse.

Fig. 11. DNA of the control group(Normal state).

Fig. 12. Exposed in high HCN breaking DNA of mouse.

Table 6. Comet assay analysis result

	HCN concentration (ppm)	Olive tail moment	
		Mean SD	SD
Lymphocyte	Control	1.206±0.081	0.081
	10.4 (Low)	1.603±0.174	0.174
	52.1 (Medium)	2.839±0.431	0.431
	140.0 (High)	5.054±0.912	0.912

Significant differences as compared with control:

*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

인한 호흡기계통의 조직인 폐와 기관지 폐포세척액 내의 세포 및 각 조직에 대한 comet assay 를 실시하여 이에 대한 손상여부를 확인하여 종류가 다른 가스에서의 급성노출에 대한 조직의 DNA손상 정도에 대한 자료가 확보되어야 한다고 사료된다.

IV. 결 론

화재로 인한 피해는 지속적으로 발생되고 있으며, 직접 화염에 의한 피해보다 독성 연소가스에 의한 피해가 심각함은 이미 인지 된지 오래다. 그러나 연소가스의 복합적인 독성위험은 물론이고 개별적인 화학종에 대한 인체 위험성은 매우 제한적인 범위(희생자의 병리학적 관찰 등)에서 연구되어 왔다.

본 연구에서는 국내에서 이미 수행되고 있는 가스 유해성시험에서 사용되는 실험동물(mouse)을 사용하여 화재로부터 발생하는 가스 중 시안화수소(HCN)에 대해 행동정시 시간뿐 만 아니라 병리학적 관찰, 혈액생화학분석 및 Comet assay 등 보다 정량적인 독성분석을 수행하여 다음과 같은 결론을 도출하였다.

첫째, HCN에 노출된 마우스의 해부를 통한 장기 적출 및 세포단위의 병리학적 검사결과 심장, 간, 폐, 비장, 신장, 흉선에서 울혈 및 괴사가 관찰되었으며, 특히 폐와 신장에서 조직 손상이 심하였다.

둘째, 13가지 종류의 혈액에 대한 생화학적 분석을 통해 통계적으로 매우 유의한 결과를 얻을 수 있었다. Glucose, BUN, GPT, LDH, Cholesterol, Phosphorus는 각각 유의성 있게 증가하였으며 특히 GOT와 GPT는 대조군의 결과에 비해 통계학적으로 유의하게 약 5.8배와 1.5배 증가한 것으로 나타났다 GPT, GOT, 콜레스테롤 등은 약간의 차이는 있지만 농도의존적으로 모두 증가하는 경향을 보였다. 이러한 생화학적 결과를 통해 적혈구 파괴, 간, 심장, 신장, 갑상선의 기능 및 기질적 변화가 고농도 폭로군에서 어느 정도 진행되고 있는 것으로 추측할 수 있었다.

셋째, DNA의 손상을 정량적으로 판단할 수 있는 Comet Assay 분석결과, 대조군(정상)과 대비하여 중농도, 고농도 노출군에서 DNA 손상이 나타났고, 농도가 높아질수록 노출되는 동물의 DNA 손상에도 매우 큰 영향을 미치는 것으로 확인하였다.

본 연구를 통하여 국내에서 연소가스의 유해성 평가방법으로 수행되고 있는 단순한 행동시간 분석방법뿐 만 아니라 실험동물해부를 통한 병리학적 관찰, 혈액생화학적 분석 및 DNA손상분석 등 다양한 분석을 시도하였다. 이번 연구(HCN)결과 및 향후 진행될 다양한 연소 독성가스의 추가분석은 연소 독성학분야의 유용한 기초연구자료로 활용될 것으로 기

대한다.

감사의 글

본 연구는 2012년도 한국건설교통기술평가원 첨단도시개발사업-연소가스 정량분석을 통한 건축물 마감재료 연소유해가스 평가방법 및 기준개발(과제번호:11첨단도시C03)-의 연구비 지원을 받아 수행되었습니다.

참고문헌

- [1] R.A. Anderson, A.A. Watson, and W.A. Harland, Med. Sci.Law, 21, p. 175 (1981)
- [2] H.L. Kaplan, A.F. Grand, and G.E. Hartzell, Combustion Toxicology : Principles and Test Methods, Technomic, Lancaster, PA (1983)
- [3] Fire Protection Engineering Handbook, SFPE, (2003)
- [4] W.D. Woolley and P.J. Fardell, F. Safety J., 5, p. 29 (1982)
- [5] K. G. Lee, Improvement study of the Criteria on Combustion Gases Toxicity Test p.36 (2011)
- [6] N. W. Cho, Study of Combustibility Test of Sandwich Panel, Architectural Institute of Korea, Journal of Scholar Conference Fixture, Article 26, NO.1 (2006)
- [7] K. N. YI, O. H. Kwon, Clinical Pathology File Medical Publish (2000)
- [8] Sheena E. M. Lewis & Ishola M. Agbaje. Mutagenesis, pp1-8 (2008)
- [9] Hyeon-Yeong Kim, Sung-Bae Lee, Hae-Won Cho, Min-Gu Kang, Jeong-Sun Yang. Food and Chemical Toxicology 47, 2294-2301 (2009)
- [10] N. W. Cho, J. C Lee, D. H. Rie, A Comparative Study on Toxic Gas Index and Sop Time of Mouse Activity, J. of Korean Institute of Fire Sci. & Eng. Vol. 25, No. 4, (2011)