

## 호흡기 3D 조직모델(SoluAirway™)의 품질과 독성평가에 대한 국내 확립 연구

정미호<sup>1†</sup>, 김설영<sup>2†</sup>, 김준우<sup>1</sup>, 방인재<sup>1</sup>, 김가은<sup>3</sup>, 김혜수<sup>2</sup>, 이수현<sup>2</sup>, 김하룡<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>성균관대학교 약학대학, <sup>2</sup>(주)바이오솔루션 부설연구소, <sup>3</sup>대구가톨릭대학교 약학대학

### Establishment Study on Quality and Toxicity Testing of Respiratory 3D Tissue Model (SoluAirway™) in Korea

Mi-Ho Jeong<sup>1†</sup>, Seol-Yeong Kim<sup>2†</sup>, Jun-Woo Kim<sup>1</sup>, In-Jae Bang<sup>1</sup>, Ga-Eun Kim<sup>3</sup>, Hye-Soo Kim<sup>2</sup>, Su-Hyon Lee<sup>2</sup>, Ha-Ryong Kim<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>School of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon 16419, Korea

<sup>2</sup>R&D Institute, Biosolution Co., Ltd., Seoul 01811, Korea

<sup>3</sup>College of Pharmacy, Daegu Catholic University, Gyeongsan 38430, Korea

**ABSTRACT.** The concern of health and safety is growing due to increasing exposure of inhalable chemicals. However, there is no appropriate alternative testing method for assessing the hazard caused by inhalation exposure. The aim of this study is to establish respiratory 3-dimensional (3D) tissue model which can be applied for assessing the toxicity testing in Korea.

First of all, respiratory 3D tissue model, SoluAirway™ was reconstituted by using human nasal mucosa. For evaluating its stability, the viability, Trans-Epithelial Electric Resistance (TEER), and histology was analyzed after delivered to 3 areas in Korea. Then, bleomycin (BLM) and polyhexamethylene guanidine phosphate (PHMG) which were known as toxic materials in pulmonary system were treated to various 3D tissue models to demonstrate applicability in evaluating chemical toxicity. The cytotoxicity and secretion of inflammatory cytokines was acquired with MTT and ELISA, respectively.

The cell viability, TEER and integrity of the 3D tissue model which quality was controlled between products, had no significantly different values after delivery. The cytotoxicity of BLM and PHMG showed dose-dependently. Furthermore, the secretion of IL-8 was shown at the highest concentration of BLM and PHMG-p in SoluAirway™, not in EpiAirway™. When applied to KeraSkin™ which was a skin model, the secretion of IL-8 was declined. Taken together, these data showed that SoluAirway™ could be used as toxicity testing model for inhalable substances in Korea.

**KEY WORDS:** 3D tissue model, SoluAirway™, Respiratory toxicity, Inhalation toxicity

## 서론

화학물질의 흡입 노출에 의한 건강 피해 사례가 지

속적으로 발생함에 따라 흡입독성에 대한 경각심은 그 어느 때보다 매우 높다. 국제사회에서는 화학물질의 흡입 노출이 인체에 미치는 유해성을 확인하기 위해 흡입독성 및 호흡기독성 자료를 요구하고 있다. OECD(Organization for Economic Cooperation and Development)의 시험가이드라인 436(OECD, 2009)은 비교적 적은 수의 실험동물로 화학물질의 급성흡입독성 UN GHS 분류를 가능하게 하였다. 그러나 흡입 노출에 의한 유해성을 평가할 수 있는 국제 조화 동물대체시험법은 아직 없다. 이는 눈과 피부의 국소 독성평가에 대한 동물대체시험법이 OECD 시험가이드라인으

Received: 14 December 2019

Revised: 16 December 2019

Accepted: 16 December 2019

† These authors equally contributed to this work

\* Corresponding author: Ha Ryong Kim, Ph.D.

College of Pharmacy, Daegu Catholic University, Gyeongsan 38430, Korea

Tel: 82-53-850-3618

E-mail: kimhr@cu.ac.kr

로 등재되어 있는 것과 비교된다.

호흡기계는 위치상 구강, 비강 및 인두로 이루어진 상기도, 후두와 기관 및 기관지로 이루어진 하기도, 세기관지와 폐포로 이루어진 원위기도로 구분할 수 있으며, 약 40종 내외의 다양한 세포가 위치에 따라 각기 다른 구성으로 이루어져 있다. 호흡기계의 기도벽은 밀접하게 결합한 상피세포의 연속층으로 구성되어 있으며, 상피세포로부터 분비된 점액이 외부물질로부터 보호작용을 한다. 하기도로 침투한 유해물질은 기도벽과 접촉하므로, 독성연구에서는 기관지상피세포주인 Calu-3 및 BEAS-2B, 폐포상피세포주인 A549 등이 빈번하게 사용되고 있다. 그러나 전통적인 방식의 침지배양 세포주는 세포간 결합과 점액 분비 여부 등에서 인체 호흡기계와 차이를 보인다. 따라서 인체 호흡기계의 생리적 복잡성으로 인해 세포 기반의 대체시험법 개발 연구가 어려움을 겪고 있는 것으로 생각된다.

최근 개발된 3D(three-dimension) 조직모델은 기존의 세포주 모델에 비해 인체의 생리적 특성을 잘 반영하므로, 독성평가, 약리효능 평가 등의 다양한 연구 영역에서 이상적인 모델로 고려되고 있다. 게다가 화학물질 유해성 평가를 위한 OECD 시험가이드라인에 3D 피부모델과 각막모델을 활용하는 동물대체시험법이 등재되어 있으므로 호흡기 3D 조직모델에 대해서도 적극 연구할 필요가 있다. 호흡기 3D 조직모델은 미국의 MatTek사와 스위스의 Epithelix사 등에서 인체 유래 호흡기 3D 조직모델을 재건하고 상업적으로 판매하고 있다. 그러나, 국내 구입가가 고가이고, 수입 기간이 길며, 운반 시 변질의 우려가 있어 호흡기 3D 조직모델의 국내 활용도를 높이기 위한 노력이 필요하다.

본 연구에서는 국내에서 재건한 호흡기 3D 조직모델, SoluAirway™에 대해 여러 랫트의 품질을 평가하여 품질기준을 설정하고, 국내 소재의 세 개 연구실에서 SoluAirway™의 품질을 평가하여 타 지역으로 운반한 3D 조직모델의 안정성을 평가하였다. 또한 SoluAirway™에 호흡기 독성물질인 bleomycin(BLM)과 polyhexamethylene guanidine phosphate(PHMG)를 노출시켜 독성반응을 평가하였다. 특히 MatTek사의 호흡기 3D 조직모델인 EpiAirway™와 국내에서 개발한 피부3D 조직모델 KeraSkin™과의 독성반응을 비교하였다. 이를 통해 호흡기 및 흡입독성 대체시험법 개발에서 SoluAirway™의 활용 가능성에 대해 타진하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 호흡기 3D 조직모델의 재건

국내 호흡기 3D 조직모델 SoluAirway™는 인체 유래 비점막 조직으로부터 일차배양한 비점막 세포를 분화시켜 제작하였다. 일차배양 비점막 세포를 12 mm Millicell® (Millicell cell culture insert, Merck Millipore, Germany)에 접종하여 5일 간 침지 배양하고 이후 14일간 기액 배양하여 제조하였다.

### 2. 조직생존율 측정

세포생존율은 MTT[3-(4,5-Dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]에 대한 환원능을 이용하여 측정하였다. MTT는 DPBS를 이용하여 1 mg/ml의 농도로 제조하여 사용하였다. 24웰 플레이트에 200  $\mu$ l의 MTT 용액을 분주하고 이 위에 기포가 발생하지 않도록 조직을 옮겼다. 이후 조직 내부에 100  $\mu$ l의 MTT 용액을 분주한 후, 차광하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 3시간 동안 배양하였다. 배양이 완료되면 조직 내 외부의 MTT용액을 제거하고 2 ml의 이소프로필알코올이 분주된 24웰 플레이트에 조직을 침지시켜 상온에서 3시간 동안 포르마잔을 추출하였다. 추출된 포르마잔을 96웰 플레이트에 250  $\mu$ l씩 옮긴 다음, 마이크로플레이트 리더(VersaMax, Molecular devices, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군을 100%로 하여 노출군의 세포생존율을 계산하였다.

### 3. 상피간 전기저항도 측정

자극시험 전 후 호흡기 3D 조직모델의 상피간 전기저항도 변화를 측정하기 위해 6웰 플레이트에 각 웰 당 배지 5 ml을 분주한 후 조직을 옮겼다. 조직 내부에 400  $\mu$ l의 배지를 넣고 Millicell ERS-2 Voltometer (MerckMillipore, Germany)를 이용하여 상피간 전기저항도(Trans-Epithelial Electric Resistance)를 측정하였다.

### 4. 3D 조직 염색

호흡기 3D 조직모델을 4% 포르말린으로 고정한 후 알코올을 이용하여 탈수화 과정을 거치고 xylene

으로 청명한 다음 파라핀에 포매하였다. 4  $\mu\text{m}$ 로 절단하여 얻은 절편을 100%, 95%, 90%, 85% 및 70% 알코올로 각 5분간 처리하여 증류수로 흡수한 다음 hematoxylin과 eosin으로 염색한 후, 조직을 탈수 및 봉입하고 광학현미경으로 관찰하였다.

## 5. 호흡기 3D 조직모델을 이용한 독성시험

본 시험을 위한 3D 기관지 상피 모델은 국내생산 모델인 SoluAirway™ 과 미국 MatTek사의 EpiAirway™ 을 사용하였다. 냉장으로 배송되는 3D 조직모델의 안정화를 위하여 납품 받은 직후, 조직을 배송용 아가로스 겔 플레이트에서 분리하여 배지가 있는 6웰 플레이트에 옮긴 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 세포배양기에 배양하여 최소 22 ± 2 시간 동안 전배양하였다.

액상의 시험물질 40  $\mu\text{l}$ 를 호흡기 3D 조직모델 표면에 고르게 적용한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 3시간 동안 적용하였다. 충분한 양의 PBS를 이용하여 3D 조직모델이 있는 culture insert 내부에 넘쳐흐르도록 하여 시험물질을 제거하였고 동일한 방법으로 총 4회 세척하였다. 조직 내부에 잔류한 PBS는 피펫을 이용하여 제거하고 외부는 멸균거즈로 닦아낸 다음, 조직은 상피간 전기저항도 측정과 조직생존율 측정에 사용하고 배양액은 사이토카인 측정에 사용하였다.

## 6. 사이토카인 측정

시험물질 적용 완료 후, 염증성 사이토카인을 측정하기 위해 조직 배양액을 회수하여 사용 직전까지 -70°C에 보관하였다. IL-6(D6050, R&D, USA)와 IL-8 (D8000C, R&D, USA) ELISA kit를 이용해 배양 배지로 분비된 사이토카인을 측정하였으며, 시험방법은 kit와 함께 제공된 프로토콜을 준수하여 실시하였다.

## 7. 통계 분석

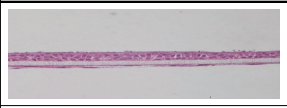
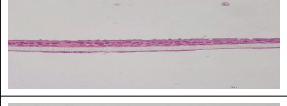
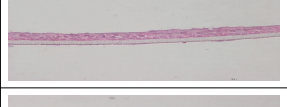
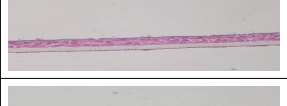
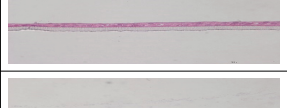
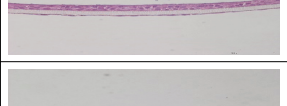
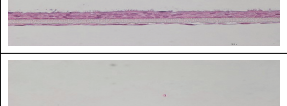
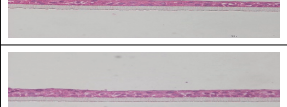
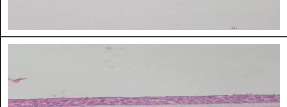
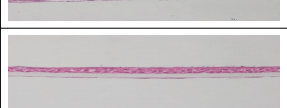
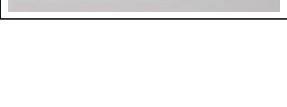
실험 결과는 모두 3회 이상 반복하여 평균 및 표준편차로 나타냈다. GraphPad Prism 5.0 프로그램에서 제공하는 one-way ANOVA과 Tukey's test를 통해 통계적 유의성을 검증하였으며, *p* 값이 0.05 이하일 경우 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

# 결 과

## 1. SoluAirway™의 품질평가

SoluAirway™의 품질평가를 위해 MTT assay를 이용한 조직생존율, 상피간 전기저항도, 조직병리 분석을 실시하였다. MTT assay를 통해 랫트 별로 1.18 ± 0.29의 흡광도 수치를, 상피간 전기저항도는 1.11 ± 0.26 K $\Omega$  · cm<sup>2</sup>를 나타냈다. 모든 랫트의 조직병리 분석 결과, 특별한 이상은 발견되지 않았다. 랫트별 품질평가 결과를 표 1에 나타냈다.

표 1. 호흡기 3D 조직모델의 랫트별 품질평가 결과

HNM lot#	TEER (K $\Omega$ · cm <sup>2</sup> )	O.D	Histology
HNM18001	1.29±0.08	1.02	
HNM18002	1.08±0.07	1.28	
HNM18003	1.16±0.07	1.12	
HNM18004	1.03±0.11	1.11	
HNM18005	0.76±0.10	0.70	
HNM18006	0.96±0.13	0.88	
HNM18007	0.82±0.04	0.97	
HNM19001	1.27±0.13	1.30	
HNM19002	0.92±0.05	1.55	
HNM19003	1.39±0.21	1.52	
HNM19004	1.62±0.08	1.56	

서울에서 재건한 SoluAirway™ 를 이동거리가 가까운 수원과 이동거리가 상대적으로 먼 정읍, 경산의 연구실로 배송하였다. 배송한 지역에서 SoluAirway™ 의 품질평가를 위해 MTT assay, 상피간 전기저항도, 조직병리 분석을 실시하였다. 수원의 연구실에서의 흡광도는  $0.88 \pm 0.08$ , 상피간 전기저항도는  $350.1 \pm 63.9 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 였으며, 정읍의 연구실에서의 흡광도는  $0.78 \pm 0.03$ , 경산의 연구실에서의 흡광도는  $0.81 \pm 0.02$ , 상피간 전기저항도는  $375.3 \pm 21.3 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 였다. 정읍 소재의 연구실에서는 측정 장비의 호환성 문제로 상피간 전기저항도를 측정하지 못했다. 3개 연구실에서의 호흡기 3D 기관지 상피모델의 세포생존율 흡광도는 0.7~0.8로 유사한 수치를 보였으며, 상피간 전기저항도는 대략  $350 \Omega \cdot \text{cm}^2$  정도의 수치를 보여

유사한 것을 확인하였다. 3개 연구실에서의 조직병리 분석 결과 특별한 이상이 발견되지 않았다(그림 1). 결국 SoluAirway™ 는 국내 소재의 타 지역에서 품질의 차이가 없이 안정적인 것으로 생각되었다.

## 2. 호흡기질환 유발물질을 이용한 3D 기관지 상피모델 독성평가

SoluAirway™ 와 미국 MatTek사의 EpiAirway™ 에 호흡기독성 유발물질인 BLM(800, 2400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )과 PHMG(40, 80, 240  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )를 가하여 호흡기 3D 조직 모델에서 독성평가를 실시하였다. 그 결과, 두 모델 모두에서 농도의존적으로 세포생존율이 감소하는 유사한 결과를 나타냈다(그림 2).

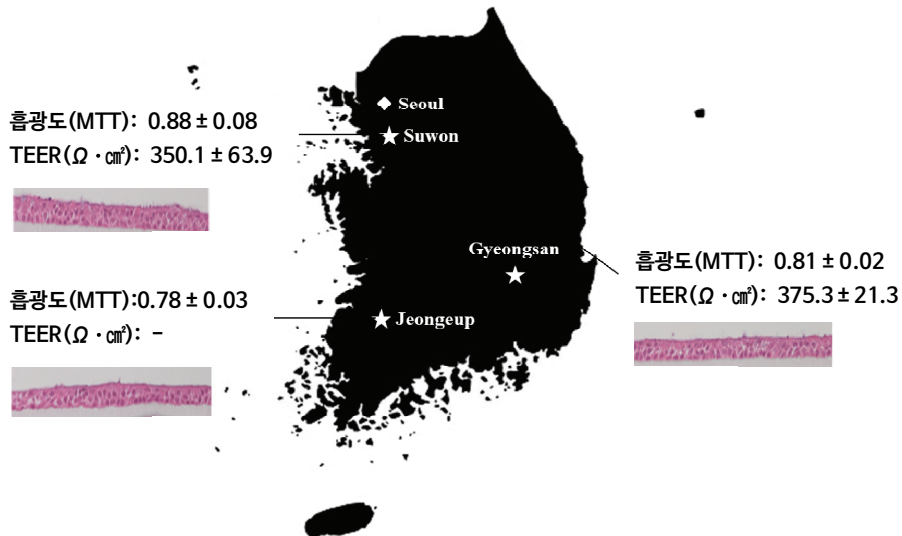


그림 1. SoluAirway™ 이동 후 품질평가 결과

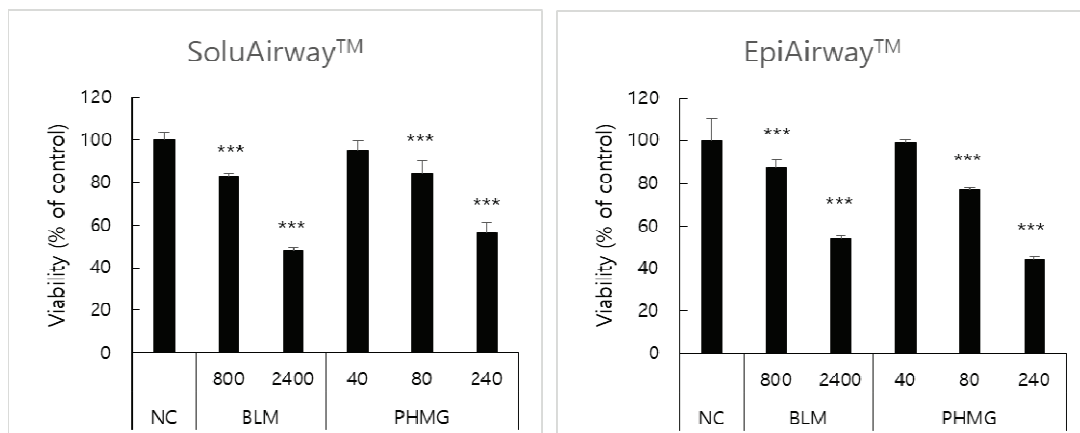


그림 2. 호흡기독성 유발물질에 의한 SoluAirway™와 EpiAirway™의 세포생존율 변화(BLM, bleomycin; PHMG, polyhexamethylene guanidine phosphate)

배양상등액에서 염증성 사이토카인인 IL-8과 IL-6의 분비량을 측정하였다. EpiAirway™에서는 두 종류의 사이토카인 모두의 기저 수준이 SoluAirway™에 비해 높았다. IL-8은 SoluAirway™에서 약 900 pg/ml, EpiAirway™에서 약 2600 pg/ml로, 약 3배의 차이가 나타났다(그림 3). IL-6은 SoluAirway™에서 11.4 pg/ml, EpiAirway™에서 24.9 pg/ml로, 약 2배의 차이가 나타났다(그림 4). 결국, EpiAirway™에서는 기저 수준의 염증성 사이토카인의 분비량이 SoluAirway™에 비해 2배에서 3배 높은 것으로 확인되었다.

SoluAirway™에서의 IL-8의 경우, 최고 농도의 BLM 및 PHMG 처리군에서 IL-8의 분비량이 유의적으로 증가하였지만, 낮은 농도에서는 변화가 없거나 오히려 분비량이 감소하였다. EpiAirway™에서의 IL-8은 BLM 및 PHMG 처리군에서 조직모델간 오차 범위가 크며 유의한 증가는 관찰되지 않았다(그림 3).

한편 IL-6의 경우, 두 조직모델 모두에서 BLM 및 PHMG 처리에 의해 분비량이 줄어드는 경향을 보였으며, SoluAirway™에서는 유의한 감소를 나타냈다(그림 4).

다른 조직모델에서도 유사한 IL-8 반응이 나타나는지 확인하기 위해, 피부 3D 조직모델인 KeraSkin™에 호흡기독성 유발물질을 처리하였다. BLM(800, 2400 µg/ml)과 PHMG(40, 80, 240 µg/ml)를 처리한 결과, 모든 시험군에서 IL-8의 분비량이 감소하였다(그림 5).

## 토 의

실험동물에 대한 생명윤리 의식이 확산되면서, 전 세계적으로 인체의 독성영향을 예측할 수 있는 신규 첨단 기법을 도입하는데 전력을 다하고 있다. 특히 3D 조직모델은 이에 대한 좋은 방안으로 여겨지고 있

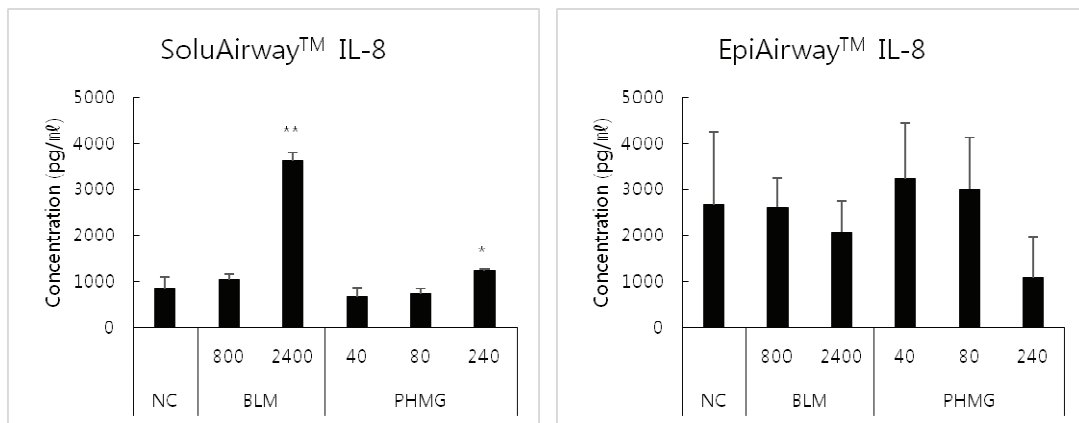


그림 3. 호흡기독성 유발물질에 의한 SoluAirway™와 EpiAirway™의 IL-8 분비 변화(BLM, bleomycin; PHMG, polyhexamethylene guanidine phosphate)

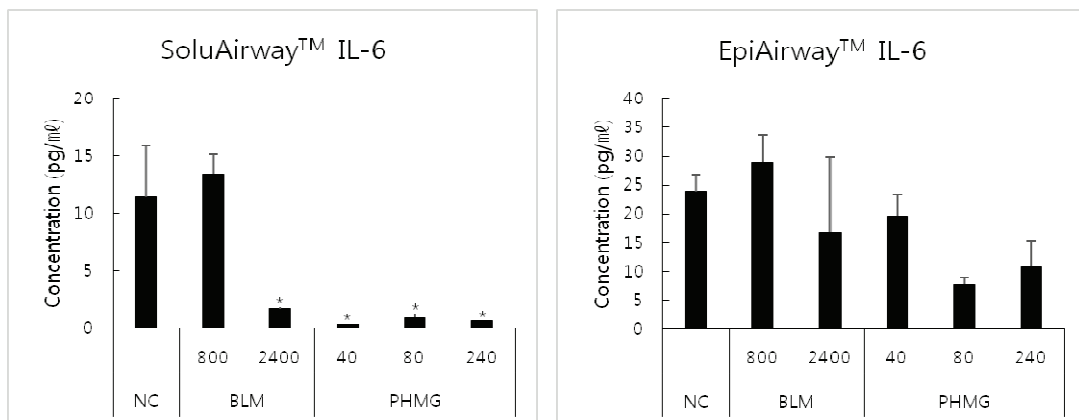


그림 4. 호흡기독성 유발물질에 의한 SoluAirway™와 EpiAirway™의 IL-6 분비 변화(BLM, bleomycin; PHMG, polyhexamethylene guanidine phosphate)

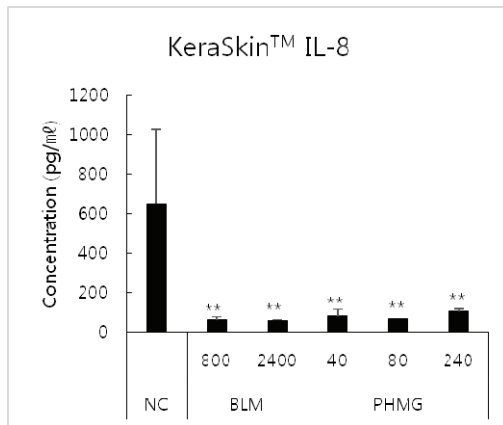


그림 5. 호흡기독성 유발물질에 의한 KeraSkin™의 IL-8 분비 변화(BLM, bleomycin; PHMG, polyhexamethylene guanidine phosphate)

다. 피부 부식성 평가에 관한 OECD 시험가이드라인 431의 경우, MatTek사의 EpiDerm™ 와 EpiSkin사의 EpiSkin™ 등을 이용한 시험법이 등재되어 있다(OECD, 2019a). 또한 각막의 손상을 평가하기 위한 OECD 시험가이드라인 492에는 MatTek사의 EpiOcular™ 와 EpiSkin사의 SkinEthic™ HCE 등을 이용한 시험법이 등재되어 있다(OECD, 2019b). 그러나 호흡기 3D 조직모델은 아직 국제 조화 대체시험법으로 활용되고 있는 바가 없다. 본 연구는 국내에서 개발한 호흡기 3D 조직모델, SoluAirway™ 에 대한 첫 번째 논문으로, SoluAirway™ 가 국내의 여러 지역에서 안정성을 유지하는 것을 확인하였으며, 호흡기 독성물질 2종의 독성반응 비교평가를 통해 호흡기 독성평가에 대한 활용 가능성을 확인하였다.

3D 조직모델의 안정성은 독성평가 결과의 재현성에 영향을 미칠 수 있다. 따라서 우선적으로 SoluAirway™ 의 품질을 평가하였다. 여러 랫트에서의 품질을 평가한 결과 조직병리에는 이상이 없었다. 또한 새롭게 재건하여 국내의 각 지역에 배송한 SoluAirway™ 는 조직생존율과 상피간 전기저항도가 랫트별 품질의 평균에 비해 낮으나 조직병리에는 이상이 없었다. 3개 지역에서 유사한 품질수준을 나타냈으므로, 국내 지역에서 안정적으로 SoluAirway™ 를 사용할 수 있을 것이라 생각되었다. 그러나 향후 더욱 많은 수의 품질평가를 통해 품질기준을 확보해야 할 필요가 있다.

시험물질에 의한 세포생존율의 변화는 3D 조직모델을 이용한 피부와 눈의 국소 독성평가에 사용하고 있는 지표이다. 아직까지 호흡기에 대한 국소 독성 혹은 흡입독성에 대한 국제 조화 대체시험법은 없지만, 세

포생존율을 이용한 대체시험법 개발은 지속적으로 시도되고 있다. Ihekwereme 등(2014)은 기관지 술잔세포인 calu-3 세포주를 96웰 플레이트에 침지 배양하여 18종 시험물질에 대한 호흡기 자극성 사전검증 연구를 실시하였다. 시험물질을 0.2%의 농도로 처리한 후, 세포생존율 50%를 기준으로 자극성 유무를 평가한 결과, 44%의 민감도, 100%의 특이도, 72%의 정확도를 나타냈다. 그러나 시험물질의 수가 제한적이었던 한계가 있었다. Jeong 등(2019)은 기액 배양을 통해 calu-3 세포주의 세포간 결합 및 점액 분비를 유도한 후, 급성흡입독성에 대한 대체시험법 개발을 시도하였다. 60종의 시험물질을 5%의 농도로 처리한 후, 세포생존율 40%를 기준으로 급성흡입독성 유무를 평가한 결과, 82%의 민감도, 73%의 특이도, 78%의 정확도를 나타냈다. 그러나 해당 시험법에서 GHS 분류에 대한 예측은 불가능하였다. Jackson 등(2018)은 EpiAirway™ 를 이용하여 흡입 노출에 의한 유해성 예측 사전검증 연구를 실시하였다. 59종의 시험물질의 IC75에 대해 150 mg/ml를 기준으로 하여 급성흡입독성과 특정 표적장기 독성(1회 노출)에 대한 시험법의 성능을 분석하였다. 급성흡입독성에 대해 100%의 민감도, 43.1%의 특이도, 21.6%의 양성예측도, 100%의 음성예측도, 50.8%의 정확도를 보였으며, 표적장기 독성(1회 노출)에 대해 75.0%의 민감도, 56.5%의 특이도, 73.0%의 양성예측도, 59.1%의 음성예측도, 67.8%의 정확도를 보였다. 저자들은 시험법의 성능을 개선하기 위해 시험물질의 수를 늘리는 추가 연구를 언급하였다. BLM과 PHMG는 흡입 노출 시 염증과 폐섬유화를 유발하는 물질로 유의적인 상피세포 생존율 감소를 유도한다(Kim 등, 2016; He 등, 2016). SoluAirway™ 와 EpiAirway™ 에 BLM과 PHMG를 처리하였을 때, 두 모델 모두에서 농도의존적인 세포생존율 감소가 나타났다. 따라서 SoluAirway™ 는 EpiAirway™ 와 같이 세포생존율을 이용한 흡입 노출 유해성 예측 시험법으로의 가능성을 보였다고 생각된다.

이전의 연구들은 BLM과 PHMG가 활성산소를 증가시켜 NF- $\kappa$ B의 활성화를 유도함으로써 IL-8를 발현시키고, 이를 통해 염증과 섬유화 유발을 야기할 것으로 예상하였다(Kim 등, 2015; Gon 등, 2000). BLM과 PHMG를 처리한 SoluAirway™ 에서는 유의적인 IL-8 분비가 확인되었으나, EpiAirway™ 에서는 유의성이 나타나지 않았다. 그 원인은 기저 수준의 사이토카인 분비량과 웰간 편차라고 생각된다. EpiAirway™ 는 SoluAirway™ 에 비해 IL-6와 IL-8의 분비량이 많았으며, 웰간 편차도 크게 나타났다. 이는 3D 조직모

텔의 안정성 차이에 의한 것으로 추정되나, 더욱 많은 조직모델을 이용하여 추가 분석이 필요하다. IL-6의 경우, 두 모델 모두에서 대조군에 비해 감소되는 경향을 나타냈다. IL-6의 체내 동태를 살펴보면, 외부 물질 노출 직후 분비가 증가하였다가, 빠르게 감소하는 양상을 보인다(Tappe 등, 2016; Sugita-Konishi와 Pestka, 2001; Nordenh ll 등, 2000; DeForge와 Remick, 1991). 그러나 IL-8은 서서히 분비가 상승하여 지속되는 경향이 있다(Tappe 등, 2016; Sugita-Konishi와 Pestka, 2001; DeForge와 Remick, 1991). 따라서 IL-6의 동태와 BLM과 PHMG에 의한 세포 손상으로 인해 대조군 보다 낮은 수준의 IL-6이 측정된 것으로 추정된다.

국내 피부모델인 KeraSkin™ 에 BLM과 PHMG를 처리하였을 때, IL-8의 분비는 나타나지 않았다. 가습기살균제 피해자들에게 진단된 질환들을 검토하였을 때, 폐질환 이외에도 피부질환이 보고된 바 있으나(Kim과 Paek, 2016), PHMG의 경피독성은 2000 mg/kg 초과 수준으로 무해한 수준이었다. BLM과 PHMG는 호흡기에 특이적인 독성을 유발하는 것으로 알려져 있으나, 이를 조직 특이적인 결과로 추정하기에는 시험물질이 부족하므로 표적장기 독성을 유발하는 물질들을 이용하여 추가 실험이 필요하다.

결론적으로 SoluAirway™ 는 국내에서 안정적으로 활용될 수 있으며, 세포생존율을 이용한 대체시험법 개발을 시도할 가치가 있을 것으로 생각된다. 그러나 확실한 품질을 보장하기 위해서는 더욱 많은 수의 품질평가를 수행하여 적절한 품질 기준을 선정해야 할 것이다. 또한 사이토카인 분비를 이용하여 대체시험법을 개발하기 위해서는 각 사이토카인의 동태 및 분비 특성을 이해하는 것이 선행되어야 할 것으로 보인다. 또한 세포의 종류에 따라 분비되는 사이토카인이 다르므로, 인체에서의 복합적인 독성을 이해하기 위해서는 상피세포 이외에 실질세포가 포함된 호흡기 전층모델을 개발할 필요가 있을 것으로 생각된다. 본 연구를 통해 국내에서도 호흡기 3D 조직모델을 이용한 대체시험법의 개발이 더욱 적극적으로 시도되기를 기대한다.

## 감사의 글

본 연구는 한국환경산업기술원 안심 살생물제 관리 기반 기술개발사업(2018002490005)의 지원을 받아 수행하였습니다.

## References

- DeForge LE, Remick DG. (1991) Kinetics of TNF, IL-6, and IL-8 gene expression in LPS-stimulated human whole blood. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 174(1), 18-24.
- Gon Y, Hashimoto S, Nakayama T, Matsumoto K, Koura T, Takeshita I, Horie T. (2000) N-acetyl-L-cysteine inhibits bleomycin-induced interleukin-8 secretion by bronchial epithelial cells. *Respirology*, 5(4), 309-313.
- He Y, Lan Y, Liu Y, Yu H, Han Z, Li X, Zhang L. (2016) Pingyangmycin and bleomycin share the same cytotoxicity pathway. *Molecules*, 21(7), pii: E862.
- Ihekwereme C, Esimone C, Shao D, Agu RU. (2014) Preliminary studies on validation of calu-3 cell line as a model for screening respiratory mucosa irritation and toxicity. *Pharmaceutics*, 6(2), 268-280.
- Jackson GR Jr, Maione AG, Klausner M, Hayden PJ. (2018) Prevalidation of an acute inhalation toxicity test using the EpiAirway in vitro human airway model. *Applied In Vitro Toxicology*, 4(2), 149-158.
- Kim HR, Lee K, Park CW, Song JA, Shin DY, Park YJ, Chung KH. (2016) Polyhexamethylene guanidine phosphate aerosol particles induce pulmonary inflammatory and fibrotic responses. *Archives of Toxicology*, 90(3), 617-632.
- Kim HR, Shin DY, Chung KH. (2015) The role of NF-κB signaling pathway in polyhexamethylene guanidine phosphate induced inflammatory response in mouse macrophage RAW264.7 cells. *Toxicology Letters*, 233(2), 148- 155.
- Kim S, Paek D. (2016) Humidifier Disinfectant Disaster, what do we know and what are left to be clarified?. *Environmental Health and Toxicology*.
- Nordenhäll C, Pourazar J, Blomberg A, Levin JO, Sandström T, Adelroth E. (2000) Airway inflammation following exposure to diesel exhaust: a study of time kinetics using induced sputum. *European Respiratory Journal*, 15(6), 1046-1051.
- OECD. (2009) OECD guideline for testing of chemicals, Section 4: Health effects, Test No. 436. Acute Inhalation Toxicity – Acute Toxic Class Method. OECD.
- OECD. (2019a) OECD guideline for testing of chemicals, Section 4: Health effects, Test No. 431. In vitro skin corrosion: reconstructed human epidermis (RHE) test method. OECD.
- OECD. (2019b) OECD guideline for testing of chemicals, Section 4: Health effects, Test No. 492. Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage. OECD.
- Sugita-Konishi Y, Pestka JJ. (2001) Differential upregulation of TNF-alpha, IL-6, and IL-8 production by deoxy-nivalenol (vomitoxin) and other 8-ketotrichothecenes in a human macrophage model. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 64(8), 619-636.
- Tappe D, Pérez-Girón JV, Zammarchi L, Rissland J, Ferreira DF, Jaenisch T, Gómez-Medina S, Günther S, Bartoloni A, Muñoz-Fontela C, Schmidt-Chanasit J. (2016) Cytokine kinetics of Zika virus-infected patients from acute to convalescent phase. *Medical Microbiology and Immunology*, 205(3), 269-273.