

불화규산의 급성독성 및 일반약리연구

김성진^{1*} · 김유영¹ · 최부병²

경희대학교 치과대학, ¹약리학교실, ²보철학 교실

Studies on Acute Toxicity and General Pharmacology of Fluorosilicic acid

Sung-Jin KIM^{1*}, Yoo Young KIM¹, Boo Byung CHO²

¹Department of Pharmacology and ²Department of Prosthodontics, School of Dentistry, Kyung Hee University

(Received May 1, 2000; accepted June 1, 2000)

Abstract – To determine biosafety of fluorosilicic acid as a source of fluoride, we carried out acute toxicity and general pharmacological studies using mouse. Fluorosilicic acid had little effects on general behavior, pain response, convulsion, skeletal muscle function and intestinal mobility as compared to controls. It had either little adverse effects on alkaline phosphatase and collagen levels in osteoblast cells. This study supports the safety of fluorosilicic acid in animals.

Keywords □ fluorosilicic acid, general pharmacology, acute toxicity

치아우식증은 구강에서 빈번히 발생하는 만성 질환중의 하나로서으로서 개인적으로나 국가적으로 많은 노동력과 경제적 손실을 가져온다. 선진국에서는 치아우식증의 이환율이 감소하는 추세이나 우리나라는 생활수준의 개선에도 불구하고 식생활 변화와 같은 발병의 주요 원인이 상대적으로 증가하여 오히려 높아지고 있어 적극적인 예방 대책이 요구되고 있다.

1771년 Scheele에 의해 처음 발견된 불소는 골 내에 존재하며 치아의 표면 상태나 구조를 변화시켜 치아우식증을 예방하는 물질로 알려져 있다. 그러므로 음식을 통한 불소 섭취의 결핍은 치아질환에 있어서 매우 중요한 원인으로 보인다. 불소는 여러 가지 작용을 통하여 충치를 억제한다. Hydroxyapatite crystal이 산에 잘 녹지 않도록 하며 (Gron 등 1963) 또한 enamel의 remineralization에도 관여한다고 알려져 있다(Weatherell 등 1972). 그리고 불소는 bacterial plaque에 선택적으로 침착하여 plaque matrix에서 효소억제작용을 증가시킴으로서 enamel의 탈회에 관여하는 lactic acid와 phosphoenolpyruvic acid의 생성을 억제한다(Tatevossian 1990). 이런 면에서 불소는 치아우식증의 예방적인 측면에서 최근 많은 관심이 요구되고 있다. 불소 공급 방법 중에서도 관급수의 불소화는 그 중 가장 경제적으로 충치예방 효과를 기대할 수 있는 방법이다. 선진국의 경우

이런 상수도수의 불소화를 통해 국민의 충치예방에 효과를 가져오고 있으며 우리 나라에서도 1981년에 진해시를 시작으로, 1998년 현재 13개 도시에서 관급수의 불소화가 시범 사업으로 이루어지고 있으며 이들 지역은 현재 다른 지역과 달리 충치이환율이 크게 감소하고 있어서 앞으로 타 도시에서도 관급수의 불소화가 추가 실시될 경우 이에대한 기초자료를 제공하고 있다. 불화규산은 그 자체가 독성을 가지고 있는 데다가 카드뮴, 비소 등과 같은 중금속이 함유된 인광석을 처리하여 생산해 내기 때문에 이런 인체유해물질들이 혼입될 가능성이 있다. 관급수의 불소화를 실시하고 있는 선진국에서는 이러한 불화규산의 충치예방 효과와 인체에 미치는 영향에 관한 조사 및 분석이 이루어지고 있기 때문에, 우리 나라에서도 국내에서 생산되는 불화규산에 대해서 우리의 실정에 맞는 연구가 필요할 것으로 생각된다. 불소를 과량으로 복용했을 때 위장관 장애, 신경정신장애, 비뇨기 장애, 피부질환 근육질환, 심장병, 선천성 유전병등과 같은 생체에 심각한 독성을 나타낸다고 보고되고 있다(Murray 등, 1991; Petersen 등 1988; Alhassan 등 1982). 또한 과량의 불소섭취로 인한 skeletal fluorosis의 발생이 보고되고 있으며, 이와 같은 fluoride toxicity는 칼슘 결핍이 뼈에 미치는 대사적 영향을 더욱 악화시키는 것으로 알려지고 있다(Teotia 등, 1998) 그러므로 본 연구에서는 치아우식증 예방에 효과적이라고 알려진 불소의 이용도를 넓히고 실질적으로 불소의 공급원으로서 사용 될

*To whom correspondence should be addressed.

수 있는 국내에서 생산되는 불화 규산의 독성 및 *in vitro* 와 *in vivo*에서의 일반 약리 실험을 바탕으로 불화 규산이 인체에 미칠 수 있는 독성 및 약리 작용을 검증하며 이 결과를 통하여 불화 규산을 관급수 불소화 사업의 활용도를 넓히는데 있어 그 효능과 안정성에 대한 기초 연구 자료로써 활용하고자 한다.

실험방법

실험동물

실험동물로 사용한 마우스는 Sprague-Dawley계 웅성으로서 중앙실험동물에서 공급받아 사용하였다. 실험동물은 구입 후 일주일동안 적응시킨 후 일반상태를 관찰하여 건강한 동물만을 시험에 사용하였으며 밤낮의 구분을 주었으며 고형사료(삼양유지(주))의 사료를 급식하였고, 실험 전까지 공급한 물은 멸균상수도수를 자유롭게 섭취도록 하였다.

시험물질

시험에 쓰인 불화규산은 실온에서 보관하여, 사용시 멸균상수도수에 희석하여 사람의 하루 섭취하는 것으로 예상되는 임상사용량인 1 ppm과 그것의 10배, 100배의 3가지 농도를 사용하여 하루 섭취량을 일회 경구 투여 한 후 각종 일반 약리실험을 시행하였다. 미국실험동물학회에서 보고된 마우스의 하루 물 섭취량은 6 ml임으로 불화규산 1 ppm 함유 음용수를 하루동안 먹을 경우 0.006 mg의 불화규산을 섭취한다

시약

Collagen과 Alkaline phosphatase 측정은 각각 Sircol collagen assay kit(Biocol Ltd)와 영동제약의 제품을 사용하였으며 대조약물 및 기타 시약은 Sigma Chem. Co.의 제품을 사용하였다. 불화규산용액은 남해화학(주)으로부터 공급 받았다. 조골세포(UMR106, osteosarcoma cell)은 한국세포주 은행으로부터 구입하였다.

In-vitro 시험

Alkaline phosphatase활성측정

Osteosarcoma cell(UMR106)에 농도별로 검체를 투여한 후 16시간 후 세포를 배양접시에서 분리하고 lysis시킨 후 세포균질기로 균질화시킨 상층액에서 alkaline phosphatase 활성을 영동제약의 kit를 이용하여 측정하였다(Cavino 등, 1998).

Collagen함량 측정

Osteosarcoma cell(UMR106)에 농도별로 검체를 투여한 후 16시간 후 세포를 배양접시에서 분리하여 Sircol assay

kit(Biocol Ltd)를 이용하여 collagen 함량을 측정하였다.

In-vivo 시험

일반행동에 미치는 영향

체중 20~25 g 정도의 마우스를 군당 6마리를 사용하여 시험 검체 농도별로 경구투여한 다음 15분 후에 실험용 관찰 케이지에 넣어 관찰하였다. 대조군에는 멸균 상수도수만을 투여하였으며, 관찰방법은 주로 Irwin(1968)의 방법에 준하여 변형한 방법(Lee, 1975)으로 실시하였다.

진통작용

초산에 의한 writhing 횟수측정은 Whittle(1964)의 방법에 준하여 실시하였다. 체중 20~25 g 정도의 웅성 6마리를 1군으로 하여 농도별로 경구투여하고 10분 후에 0.7% 초산생리식염수 0.1 ml/10 g을 복강 내에 주사한 다음, 10분 후부터 10분간에 발생하는 writhing syndrome 횟수를 측정하였다. 대조약물로는 aminopyrine(50 mg/Kg I.P)을 사용하였다.

Strychnine 유발경련에 대한 작용

마우스 웅성 6마리를 1군으로 하여 Araki 등(1972)의 방법에 따라 실시하였다. Strychnine nitrate 1.5 mg/Kg을 복강주사 후 30분간의 강직성 경련에 의한 생쥐의 사망수를 측정하였다.

장관수송능에 미치는 영향

체중 20~25 g 정도의 마우스 6마리를 1군으로 하여 검체 농도별로 경구투여한 후 10분 후에 추적물로 charcoal meal 0.2 ml 씩을 경구투여하였다. 그 30분 후에 장관을 적출하여 유문부로부터 charcoal meal의 이동거리를 전체 소장 길이의 백분율로써 나타내었다. 대조약물로는 lidocaine을 사용하였다.

골격근에 미치는 영향

현수실험

검체를 농도별로 경구투여 후 마우스를 바닥으로부터 12 cm 정도 떨어진 위치에 고정된 철사줄에 마우스의 앞발을 걸쳐 놓은 후 2초 이내에 뒷발을 걸치는 행동을 관찰하였다. 약물투여 직전을 측정된 후 약물투여 직후로부터 0.5, 1, 2, 4시간 후에 앞발을 올려놓아 뒷발을 걸치는 시간, 낙하하는 시간을 측정한다. 2초 이내에 뒷다리를 걸치지 못하거나 낙하하는 경우 근이완작용, 양성이라 판정한다. 대조군으로 chlorpromazine 10 mg/Kg B.W을 경구투여한 후 관찰한다.

Pull-up 실험

검체를 마우스에 경구투여한 후 0.5, 1, 2, 4시간 후에 앞다리를 손으로 잡고 가만히 들어올려 늘어뜨린다. 이후 뒷다리가 손에 닿는때까지 걸리는 시간을 측정한다. 이는 진정작용들을 제외한 순수한 근이완작용만을 관찰하는 방법으로 최대관찰시간은 30초이며 대조군으로 chlorpromazine 10 mg/Kg을 경구투여한다.

급성독성

6마리를 한 군으로 하여 검체를 농도별로 실험동물에 경구투여하였으며 투여 당일은 투여후 6시간까지 매 시간 마다, 투여 다음날부터 관찰 종료일인 7일까지는 1일 1회씩 동물의 일반 상태변화, 중독 증상, 폐사동물의 유무를 관찰한다. 사망동물 수를 이용하여 LD₅₀을 Litchfield-Wilcoxon 법으로 계산하였다.

통계처리

모든 실험치는 평균치±표준오차로 표시하였고, 대조군과 처치군사이의 유의성은 student's t-test로 시행하였다.

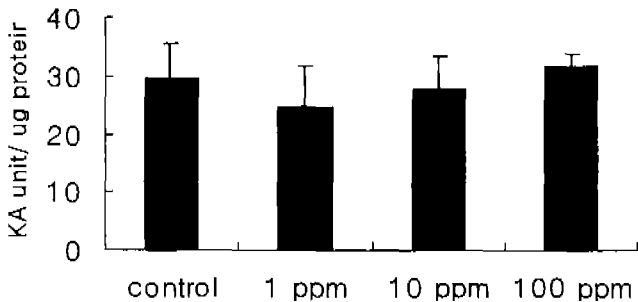


Fig. 1. Effects of fluorosilicic acid on alkaline phosphatase activity in UMR-106 cells. UMR-106 cells were treated with increasing concentrations of fluorosilicic acid. Cell lysates were subjected to alkaline phosphatase assay as described in Materials and Methods.

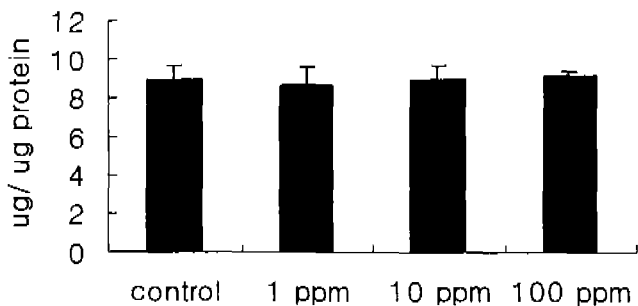


Fig. 2. Effects of fluorosilicic acid on collagen levels in UMR-106 cells. UMR-106 cells were treated with increasing concentrations of fluorosilicic acid. Cell lysates were subjected to collagen assay as described in Materials and Methods.

실험결과

Alkaline phosphatase 활성

In vivo 실험 중 조골세포에 불화규산을 농도별로 처치한 후 alkaline phosphatase 함량을 측정된 결과, 대조군에 대해 유의적인 차이를 보이지 않았으며 그 결과는 Fig. 1과 같다.

collagen함량 측정

불화규산을 농도별로 투여했을 경우 대조군과 비교시 collagen 생성에 유의적인 차이를 보이지 않았으며 Fig. 2에 그 결과를 나타내었다.

일반행동에 미치는 영향

불화규산을 농도별로 mouse에 투여하고 30분, 60분, 120분, 240분 및 24시간째에 나타나는 증상을 Irwin 다차원관찰법에 준하여 인지력, 기분, 운동성, 중추흥분, 운동협조성, 근육긴장도, 반사 및 자율신경성 징후 등에 대하여 관찰한 결과, 특이한 행동 및 증상의 변화를 관찰할 수 없었다.

진통작용

Aminopyrine을 경구 투여시에는 0.7% 초산의 경구내투

Table I. Effect of fluorosilicic acid on acetic acid-induced writhing syndrome in mice

treatment	Dose (ppm/day)	No. of animal	writhing syndrom for 10 min
control	-	6	48.3±2.5
Fluorsilicic acid	1	6	46.8±8.6
	10	6	50.0±1.8
	100	6	45.8±1.5
	aminopyrine	50(mg/Kg)	6

Significantly different from the control group (*p<0.01). Following administration of increasing concentrations of fluorosilicic acid, animals were subjected to acetic acid writhing assay as described in the Materials and Methods.

Table II. Effect of fluorosilicic acid on strychnine-induced convulsion in mice

treatment	Dose (ppm/day)	No. of used animal	No. of died mice
control	-	6	5
Fluorsilicic acid	1	6	6
	10	6	6
	100	6	6

Following administration of increasing concentrations of fluorosilicic acid, animals were subjected to strychnine-induced convulsion assay as described in the Materials and Methods.

Table III. Effect of fluorsilicic acid on intestinal propulsion in mice

treatment	Dose(ppm/day)	No.of animal	Propulsion(% M. ± S.E)	Increase(%)
control	-	6	47.5 ± 5.1	-
Fluorsilicic acid	1	6	50.72 ± 0.9	3.16
	10	6	53.6 ± 6.8	6.14
	100	6	64.3 ± 7.7	16.81
Lidocaine	30(mg/Kg)	6	43.4 ± 23.0	-4.08

Following administration of increasing concentrations of fluorsilicic acid, animals were subjected to intestinal propulsion assay as described in the Materials and Methods.

여에 의해 유발된 writhing syndrome을 현저하게 억제시켰으나, 검체 투여시에는 100 ppm의 농도에도 대조군과 비교하여 그 증상의 억제를 인정할 수 없었다. 그 결과는 Table I에 표시하였다.

스가 불화규산 1 ppm(함유수의 하루 섭취량)의 400배인 것으로 나타났다. 결과는 Table IV에 나타내었다.

고 찰

Strychnine 유발경련에 대한 작용

검체에 의한 Strychnine 유발치사 억제는 나타나지 않았으며 이에 대한 결과는 Table II에 나타나 있다.

장관수송능에 미치는 영향

활성탄을 이용한 장관수송능에 미치는 효과에 대한 실험 결과는 Table III에 표시하였다. 고농도의 검체에서도 아무런 직접적인 작용이 나타나지 아니하였다.

현수시험 및 pull-up 시험

골격근에 의한 시험으로 현수시험과 pull-up 시험을 시행한 결과 양성대조군의 증상을 특이적으로 억제하는 결과는 나타나지 않았다.

급성독성

불화규산을 마우스에 농도별로 투여한 후 사망동물수를 이용하여 LD₅₀을 Litchfield-wilcoxon 법으로 산출한 결과 125 mg/Kg(1.25×10⁷ppm)으로 임상사용량 0.3 mg/Kg(마우

조골세포에 불화규산을 농도별로 처치한 후 측정된 alkaline phosphatase 함량을 보면 대조군에 대해 유의적인 차이를 보이지 않았다(Fig. 1). Alkaline phosphatase는 골의 석회화에 중요한 작용을 하는 효소로서 위와 같은 결과로 보아 불화 규산의 총치 예방 효과는 본 실험조건에서는 alkaline phosphatase와는 관련이 없다는 것을 시사하고 있다. 불화 규산을 농도별로 투여했을 경우 대조군과 비교시 collagen 생성에 유의적인 차이를 보이지 않았으며 이것은 불화규산 이 골내의 collagen matrix의 증가에도 별 영향을 미치지 않는다는 사실을 제시한다(Fig. 2). 불화 규산이 일반행동에 미치는 영향을 알아보기 위해 인지력, 기분, 운동성, 중추흥분, 운동 협조성, 근육긴장도, 반사 및 자율신경성 징후 등을 관찰한 결과 특이한 변화가 없었다. 식수에 사용하는 불화 규산의 농도가 1 ppm인 점을 감안할 때 정상적으로 식수에 사용되는 불화 규산의 양은 거의 독성을 나타내지 않는다고 할 수 있다. 불화 규산의 진통작용에 대한 실험에서도 불화 규산은 통증억제에 아무런 영향을 끼치지 않았다(Table I). Strychnine으로 유발한 치사

Table IV. LD₅₀ of fluorsilicic acid on mice

animal	Dose(mg/Kg B.W)	days							mortality
mouse	fluorsilicic acid	1	2	3	4	5	6	7	0
	control	-	-	-	-	-	-	-	0/6(0%)
	0.05	-	-	-	-	-	-	-	0/6(0%)
	0.5	-	-	-	-	-	-	-	0/6(0%)
	2.5	-	-	-	-	-	-	-	0/6(0%)
	12.5	0	-	-	-	-	-	-	1/6(16.7%)
	25	0	0	-	-	-	-	-	2/6(33.3%)
	250	0	0	0	-	-	-	-	3/6(50%)
	500	0	0	0	0	0	0	0	6/6(100%)

Following administration of increasing concentrations of fluorsilicic acid, animals were tested for mortality as described in the Materials and Methods.

작용에 있어서도 불화 규산은 어떤 치사 억제 효과도 나타내지 않았다(Table II). 불화 규산이 장관 수송능에 미치는 영향을 본 실험 결과에서도 고농도로 처치한 실험군에서조차 약 17% 가량의 낮은 증가율만을 보였다(Table III). 불화 규산을 마우스에 농도별로 투여한 후 폐사 동물수를 이용하여 LD₅₀을 Litchfield-wilcoxon 법으로 산출한 급성 독성 실험 결과 125 mg/Kg으로 임상사용량 1 ppm용액을 하루 섭취할 경우 용량인 0.3 mg/Kg의 400배 이상인 것으로 나타났다(Table IV). 이것은 일반 관급수 내 존재하는 불화규산의 양이 일반 행동에 미치는 영향이 거의 없었던 결과와 함께 정상적으로 존재하는 식수 내의 불화규산은 매우 안전하다는 사실을 제시한다.

감사의 말씀

본 연구는 1998년도 학술진흥재단 부설연구소 과제 연구비(1998-005-F00202)와 2000년도 경희대학교 대응연구 지원에 의하여 수행되었기에 깊이 감사드립니다.

참고문헌

- Alhassan, A. and Zink, P. (1982). Histological findings in the skin of animals after percutaneous damage by hydrofluoric and hexafluorosilicic acid. *Z. Rechtsmed* **88**, 239-247.
- Araki, Y. and Ueki, S. (1972). Changes in sensitivity to convulsion in mice with olfactory bulb ablation. *Jap. J Pharmacol.* **22**, 447-456.
- Gron, P., Spinrlli, M., Trautz, O. and Brudevold, F. (1963) The effect of carbonate on the solubility of hydroxyapatite. *Archives Oral Biol.* **8**, 251-263.
- Irwin, S. In., Nodine, J. H. and Siegler, P. E. (1964). Animal and clinical pharmacologic techniques in drug evaluation. pp 36-54. Yearbook Medical Publishers.
- Lee, E. B. (1975). Pharmacological approach of crude drugs. *Yakhak Hoeji* 53-59.
- Murray, J. J., Rugg-Gunn, A. J. and Jenkins, G. N. (1991). Fluorides in caries prevention. pp 337-346. Butterworth-Heinemann Ltd.
- Petersen, L. R., Denis, D., Brown, D., Hadler, J. L. and Helgerson, S. D. (1988). Community health effects of a municipal water supply hyperfluoridation accident. *Am. J. Public Health* **78**, 711-713.
- Suzuki, A., Palmer, G., Bonjour, J.-P. and Caverzasio, J. (1999). Regulation of alkaline phosphatase activity by p 38 MAP kinase in response to activation of Gi protien-coupled receptors by epinephrine in osteoblast-like cells. *Endocrinol.* **140**, 3177-3182.
- Tagaki, K. and Lee, E. B. (1972). Pharmacological studies on *Platycodon grandiflorum* A. DC. III. Activities of crude platycodin on respiratory and circulatory systems and its other pharmacological activities. *Yakugaku Zasshi* **92**, 969-973.
- Tatcvossian, A. (1990). Fluoride in dental plaque and its effect. *J. Dental Res.* **69**, 645-652
- Teotia, M., Teotia, S. P. and Sin, K. P. (1998). Endemic chronic fluoride toxicity and dietary calcium deficiency interaction syndromes of metabolic bone disease and deformities in India: year 2000. *Indian J. Pediatr.* **65**, 371-381.
- Weatherell, J. A., Robinson, C. and Hallsworth, A. (1972). Changes in the fluoride concentration of the labial enamel surface with age. *Caries Res.* **6**, 312-324.
- Whittle, B. A. (1964). The use of changes in capillary permeability in mice to distinguish between narcotic and nonnarcotic analgesics. *Brit. J. Pharmacol.* **22**, 246-253.