

³²P-postlabelling法을 이용한 有機溶劑 作業장 근로자의 遺傳毒性 評價

홍대용 · 김장락 · 이장호 · 문종갑 · 이한우 · 김동일
박성학 · 정주화 · 이흥근*

경상대학교 의과대학 예방의학교실 및 산업의학연구소
*서울대학교 보건대학원

An Assessment of Genotoxicity on Organic Solvent Workers by ³²P-postlabelling Method

D.Y. Hong, J.R. Kim, J.H. Lee, J.G. Moon, H.W. Lee
D.I. Kim, S.H. Park, J.W. Chung and H.K. Lee

*Department of Preventive Medicine and Institute of Industrial Medicine,
College of Medicine Gyeongsang National University,
School of Public Health, Seoul National University**

ABSTRACT

To evaluate the genotoxicities of workers exposed to glue and glue cleaning solution, ambient air monitoring of working place, animal study and human monitoring were carried out.

By GC-MS analysis, air samples collected from shoemaking plant were found to be toluene, xylene, cyclohexane, n-hexane, methyl ethyl ketone, trichloroethylene, butylacetate, isopropyl alcohol.

Glue and glue cleaning solution from shoemaking plant were applicated topically to the CD-1 mice. DNA was isolated from skin 24 hr following the application and analysed for DNA-adducts using the nuclease P₁ version of ³²P-postlabelling assay. RAL (Relative Adduct Labelling, adducts/10⁸ nucleotides) was significantly increased in a dose-dependent manner in the glue cleaning solution treated mice skin.

Peripheral blood DNA-adducts of workers exposed to glue and glue cleaning solution

* 이 논문은 문교부의 1990년 대학교수 국비해외파견계획에 따라 1991년 3월부터 1992년 3월까지 미국에서 수행한 연구 결과임.

were also analysed by the same method, but there were not significant differences in the peripheral blood DNA-adducts level between exposed and control workers.

In addition, glue cleaning solution from shoes factory was evaluated for mutagenicity in the Salmonella plate incorporation assay using strains TA 100 and TA 1535 in the presence and absence of Arochlor 1254-induced rat liver S_9 .

There was evident mutagenicity for cleaning solution in TA 100 regardless of S_9 , but TA 1535 showed positive only in the absence of S_9 when predicted by Stead model of mutagenicity prediction ($p=0.0000$).

The urine concentrates from workers and controls were also assayed for mutagenicity towards strain TA 100 of Salmonella typhimurium in the presence of S_9 using Kado's microsuspension assay, but their mutagenic activities were not found to be significant.

These data suggest that shoemaking workers are exposed to genotoxic compounds and need to be monitored by testing the mutagenicity of human urines.

However, ^{32}P -postlabelling application requires further validation for the routine monitoring of human exposure.

서 론

최근의 공업발달로 인한 유기용제의 사용이 급격히 늘어나고 있는 추세이고 유기용제의 발암성을 평가하고자 하는 시도가 많아지고 있다. 한편 합성화학물질의 양은 지난 수 십년간에 걸쳐 급속도로 늘어나고 있으나 유전독성 실험이 제대로 되고 있는 물질은 수백종에 불과하여 이들 물질로 인한 위험을 규명하고 평가하는 적절한 방법의 개발이 시급하다.¹⁾

화학물질로 인한 발암성 평가는 1755년 Percivall Pott의 화학물질에 의해 암이 발생할 수 있다는 연구²⁾ 이후 작업환경과 관련한 암발생이 다수 보고되었지만 실험적 증거가 없었다. 1917년 Yamagiwa와 Ichigawa가 토끼귀의 피부에 Coal tar로 1년 가까이 매일 발라서 피부암을 유발시킴으로서 화학물질의 발암성을 검증할 수 있는 실험모형이 확립되었다.³⁾

발암성을 검증하는 방법은 크게 인간을 대상으로 하는 역학조사방법과 동물을 사용하는 실험실적 방법이 있으나 최근에 와서는 수많은 화학물질의 선별

검사법으로 변이원성검사를 채택하는 경향이 많다. 이는 Ames 등⁴⁾ 연구에 의해 대부분의 발암성 물질은 변이원성이거나 변이원 유발물질임이 밝혀진 것이 계기가 되어 역학조사나 동물실험에 비해 신속, 간단한 방법인 변이원성검사를 채택하게 되었다. 최근에는 carcinogen-DNA binding 분야의 연구 분야를 넓히기 위한 노력으로 방사성 활성물질을 필요로 하지 않는 방법이 개발되고 있으며 가장 최근의 방법으로는 autoradiography를 이용한 ^{32}P -postlabelling 방법이 있다. 이 방법은 생체조직내의 DNA-adduct의 존재와 양을 측정하는 것으로 동위원소로 표지되지 않는 carcinogen이나 mutagen을 사용하여도 화학물질과 DNA의 상호작용을 검토할 수 있고, 10^9 - 10^{10} nucleotide 중 하나 정도의 adduct가 있어도 검출할 수 있는 민감도를 가지고 있다. 유전독성물질에 대한 인간의 폭로량을 평가하기 위해서 생물학적 검체의 이용가능성에 관해서는 많은 연구가 되어져 왔다.⁵⁾ 이들 생물학적 검체 중 가장 손쉽게 구할 수 있는 소변을 이용하여 유전독성물질을 규명하기 위한 방법도 많은 발전을 보았다.^{6,7,8,9)}

1977년 Yamasaki와 Ames가 XAD-2 resin

(Styrene-divinylbenzene polymer)을 이용하여 소변을 농축하는 방법을 소개⁴⁾한 후로 많은 연구가 이루어졌는데, 이 중에는 흡연자^{10,11,12,4)} 산업장 근로자^{13,7,14,15)} 화학요법을 받는 환자¹⁶⁾, 특이식이물을 하는 사람^{17,18)} 등을 대상으로 한 연구가 행해져 왔으며, 이들 연구에서 나온 결과는 소변을 이용한 변이원성 시험이 환경성 변이원을 선별하는데 매우 유용하다는 것을 보여주고 있다. 한편 종래의 Ames test의 민감도를 높이기 위해서 수많은 방법이 개발되었다.^{17,19,20,21,22,23,24,25,26)} 최근에 와서 각광을 받고 있는 생물학적 지표(biological marker)는 체내에 들어온 발암물질이 생체내에서 일어난 반응을 나타내는 지표로서 그 종류를 크게 나누어 보면 internal dose marker, biologically effective dose markers, biological response markers, markers of subclinical disease, susceptibility markers의 5가지로 나눌 수 있다.²⁷⁾

본 실험에서 사용한 DNA adducts, protein adducts 등은 이중의 biologically effective dose markers에 속한다.

본 연구는 복합성분의 유기용제 노출로 인한 유전독성을 평가하는데 그 궁극적인 목적이 있으며, 이를 위하여 아래와 같이 나누어서 연구를 실시하였다.

- 1) 가스크로마토그래피법에 의한 작업장 공기중의 유기용제 성분분석
- 2) GC-MS법에 의한 접착제 및 세척제의 성분분석
- 3) 유기용제 작업장에서 사용되는 접착제 및 세척제의 변이원성 연구
- 4) 접착제 및 세척제를 사용하는 작업장 근로자의 소변을 이용한 변이원성 평가
- 5) Mice를 이용한 ³²P-postlabelling법에 의한 접착제 및 세척제의 유전독성 평가
- 6) 접착제 및 세척제를 사용하는 작업장 근로자의 혈액을 이용하여 ³²P-postlabelling법으로 DNA adduct를 측정함으로써 이들 근로자의 유전독성 평가

실험대상 및 연구방법

1. 실험대상

1) 대상작업장의 작업환경 측정

모 제화공장 접착부서에 근무하는 근로자들의 호흡위치에 개인용 공기포집기(Personal Air Sampler, Gillian HFS 113A)를 부착한 후 내경 4mm, 길이 70mm의 활성탄관을 부착하여 유량 0.2l/min로 공기를 채집한 후 두 끝을 완전히 밀폐시켜 -15°C에서 보관하여 GC(Hewlett Parkard 5890) 분석하였다.

2) ³²P-postlabelling법에 의한 유전독성 평가

① 유기용제 작업장 근로자

접착제 및 세척제의 노출군으로 일부 제화공장 근로자 19명, 대조군은 소음공장 근로자 22명을 대상으로 했다. 연구 대상자로부터 혈액 8-10ml을 채취하여 heparin 처리된 플라스틱병에 냉장보관시킨 후 유기용제노출로 인한 유전독성을 조사하는데 사용하였다.

② 동물실험

주령 12주 된 male CD-1 mice(Charles Rivers) 10마리를 전기면도기로 등의 털을 깎고 물과 먹이를 주며 실험전 하루동안 방치하였다. DMSO(Dimethyl Sulfoxide)로 희석한 접착제와 세척제를 micro pippette으로 200 μ l씩을 CD-1 mice의 등에 topical application시켰다. 투여 24시간 후에 Nembutal sodium solution으로 CD-1 mice를 마취시켜 sacrifice하여 CD-1 mice의 back skin을 얻어 즉시 dry ice통에 넣어 급속 냉각시킨 후 ice를 넣은 통에 보관하였다가 -80°C의 deep freezer에 보관하여 유기용제의 유전독성을 조사하였다.

3) 변이원성평가

① 세척제

모 제화공장 접착부서에서 사용되는 접착제와 세척제를 수거하여 Salmonella plate incorporation test를 하였다.

② 근로자의 소변

실험군으로 모 제화공장 근로자 19명과 대조군으로

로 소음공장 근로자 22명의 소변을 채취한 후 액체 질소로 급속냉각시킨 후 즉시 -40°C 의 deep freezer에 보관한 후 이 상태를 실험 때까지 유지하였다. 중간에 실험실까지 운반시 dry ice를 사용하여 냉동상태를 유지하였다.

냉동상태의 소변을 녹인 후 C_{18} -SPE column으로 농축한 후 Kado법²⁸⁾에 의해 변이원성시험을 하였다. Yamasaki 등⁴⁾에 의하면 소변농축액을 이용한 변이원성은 S_9 존재하(+ S_9)에서만 주로 반응하므로 + S_9 에서만 실험하였고, 본 실험군들에 있어서의 흡연의 영향을 보고자 할 때 군주 TA 1535는 담배연기에 민감하지 못하므로 사용하지 않았으며 TA 100으로 + S_9 상태에서에서만 실험을 하였다(Fig. 1 참조).

2. 연구방법

1) 대상작업장의 작업환경측정

모 제화공장 신발제작부서에서 조사대상자에게 개인시료채취기를 부착시켜 작업장 공기를 채집하여서 GC법으로 성분을 3회 분석하였다. 모든 측정기는 8시간 가중평균치(Time Weighted Average)로 환산했으며 신발제작부서에서 사용하는 접착제와 세척제를 수거하여 GC-MS법으로 다음과 같이 성분을 분석하였다.

접착제 및 세척제를 methylene chloride로 1:2로 희석하고, 160°C 에서 Cryofocusing trap에 주입한 후 45분간 방치하여 230°C 까지 trap을 가열시킨다. 처리할 시료를 GC-MS column에 주입한 후 HP-9000 Series 300/800 computer (HP-UX system, Hewlett Packard, U.S.A.)를 사용하여 분석하였다.

2) ^{32}P -postlabelling법에 의한 유전독성평가

근로자로부터 채취한 혈액 8-10ml을 heparin 처리된 plastic tube에 넣고 원심분리시켰다. DNA는 phenol mixture, Proteinase K와 Rnase를 처리하여 분리시켰다. 동물시료는 CD-mice의 back skin을 분리하여 homogenize시킨 후 혈액에서 DNA 분리시 이용한 방법에 준하여 DNA를 분리하였다. DNA($5\mu\text{g}$)를 Gupta의 방법²⁾에 따라 micrococcal

endonuclease와 spleen phosphodiesterase로 37°C 에서 3.5시간 동안 분해(digestion)시켜 3'-mononucleotides로 하였다. 민감도를 높이기 위해 DNA digests를 Reddy와 Randerath의 방법³⁾을 변형시켜 다음과 같이 nuclease P_1 으로 처리하였다.

$12.5\mu\text{l}$ 의 DNA digest($5\mu\text{g}$ DNA)에 $1.2\mu\text{l}$ nuclease P_1 ($8.0\mu\text{g}$), $1.8\mu\text{l}$ zinc chloride(0.30mM)와 $3.0\mu\text{l}$ sodium acetate buffer(0.25M , pH 5.0)를 가했다. 37°C 에서 40분간 배양시킨 후 $2.4\mu\text{l}$ 0.5M Tris base(pH 9.0)를 가해 pH를 조정하였다. ^{32}P ATP mixture 제조를 위하여 ^{32}P ATP를 dry ice에서 꺼내서 plexiglass chamber에 30분간 방치하여 녹인다음 ATP $100\mu\text{l}$, T4 polykinase $10\mu\text{l}$, buffer $25\mu\text{l}$ 의 비율로 혼합하였다. ATP $100\mu\text{l}$ 는 1mCi 에 해당한다. 따로 normal nucleotide 측정용 tube에 ATP mixture $2.5\mu\text{l}$ 를 가한 후 dry incubator에서 30분간 방치시킨 후 $195\mu\text{l}$ 의 Tris/EDTA(pH 9.5)를 혼합하여 총 $200\mu\text{l}$ 로 만들어 $5\mu\text{l}$ 씩을 TLC plate에 두번 점적하였다. 또한 Tris/EDTA buffer의 활성도를 검사하기 위하여 $24\mu\text{l}$ 의 Tris/EDTA buffer를 별도의 tube에 가해 총 $25\mu\text{l}$ 를 만든 후 TLC plate에 $5\mu\text{l}$ 씩 점적하였다. DNA digest에 $50\mu\text{Ci}$ [γ - ^{32}P]ATP, $1.5\mu\text{l}$ kinase buffer(300mM Tris base/ 100mM dithithreitol/ 10mM spermidine)와 2.5U T4 polynucleotide kinase를 함유하는 radioactive mixture $7.5\mu\text{l}$ 를 가해 labelling시킨 후 37°C dry bath에서 30분 동안 배양시켰다. 총 $26.0\mu\text{l}$ 의 labelled된 DNA 시료를 PEI-cellulose TLC plates의 origin에 점적하였다. Test sample용 TLC plate를 D1 용액에 담근 후 다음날까지 보관하였고, normal nucleotide용 TLC plate는 4.5M ammonium formate 용액에, phosphate용 TLC plate는 0.12M sodium phosphate 용액에, Tris/EDTA buffer의 활성도를 검사하기 위한 TLC plate는 4.5M ammonium formate 용액에 담근 후 꺼내서 다음날까지 plexy glass 하에서 보관하였다. 다음날 test sample용 TLC plate에서 wicks를 잘라낸 후 세척선반

(washing rack)에 고정시켜 세척조에서 탈이온증류수(deionized water)로 7분간 씻고 탈이온증류수를 버리고 다시 5분간 접촉시킨 후 D2 용액에 잠시 접촉시킨 후 Kim wipe로 닦아 D3 용액에 담근 후 2시간 동안 전개시켰다. 이 후 전개조(developing tank)의 커버를 제거하여 20분 동안 방치하여 증발을 시켰다. TLC-plate를 다시 세척조에 넣고 상기와 같이 탈이온증류수로 7분 및 5분간 처리하고 건조조(drying tank)에서 20분간 건조기로 건조시킨 다음 D4 pre-wash 용액에 잠시 담근 후 D4 용액을 사용하여 전개조에서 2시간 전개시킨 후 20분간 방치하였다. 이 후 전과 같이 탈이온증류수로 7분 및 5분 동안 세척하여 건조조에서 20분 동안 방치하였다. 3cm×10cm wicks를 stapler로 TLC plate에 붙인 후 D5 용액이 들어있는 전개조에서 하루 동안 방치하였다. TLC plates 상의 radiolabelled adduct의 존재를 확인하기 위

하여 -80°C에서 intensifying-screen-enhanced autoradiography를 행한 후 β-scintillation counter를 이용하여 Cerenkov 법에 의해 radioactivity를 측정하여 DNA adduct의 양을 측정하였다.²⁹⁾

3) RAL값의 계산

10^{-N} RAL(Relative Adduct Labelling) 값은 10^N개의 nucleotide 속에 있는 1개의 adduct를 나타내며 RAL값은 다음과 같이 계산된다.

$$RAL = \frac{\text{cpm in adduct}}{\text{cpm in total nucleotide}}$$

$$RAL = \frac{\text{cpm}_{\text{Adduct(s)}}}{\text{cpm}_{\text{Normal nucleotides}} + \text{cpm}_{\text{Adducts}}}$$

RAL값을 fmole adduct/μg DNA로 환산하면 1 adduct/10⁷ nucleotides은 0.3 fmole adduct/μg DNA에 해당한다.

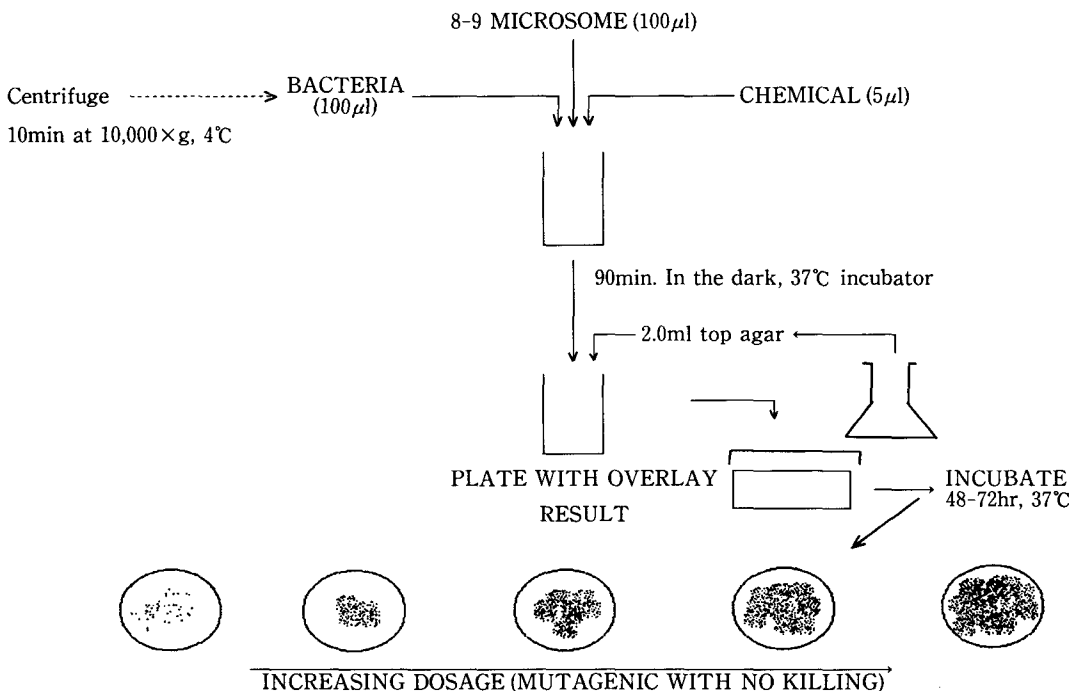


Fig. 1. Outline of the Reduced Kado Assay with mammalian activation.

4) 변이원성평가

본 실험에서 이용한 solid-phase-extraction법, Kado assay를 이용한 소변의 변이원성 검사, Salmonella typhimurium plate incorporation test를 이용한 세척제의 변이원성검사의 구체적인 방법은 아래와 같다.

i) Kado assay를 위한 소변의 solid-phase-extraction

① 실험기기 설치

100ml side arm Erlenmeyer flask (trap으로 사용)에 vacuum pump를 끼운 후 이것을 1000ml side arm Erlenmeyer flask (세척용 solvent와 추출소변을 받아내기 위해 사용)에 연결한 후 vacuum manifold에 연결하였다. Urine sample reservoir를 6ml filter column에 adapter를 이용하여 연결하였다.

② Column 조절

Vacuum manifold에 column을 연결하고 20ml B & J methanol을 각 column에 흡인시켰다. Methanol이 column에서 전부 용출되기 전에 vacuum을 꺼서 column이 건조되지 않게 하였다. 20ml의 탈이온증류수로 methanol을 column으로부터 씻어냈다. 이때 column이 건조되지 않도록 vacuum을 조절하였다.

③ 시료투여

소변 약 25ml씩을 sample reservoir에 넣고 column을 통해 흡인시켰다. 각 column을 20ml의 탈이온증류수로 씻고 완전히 건조될 때까지 흡인시켰다.

④ 시료용출

Column이 부착되어 있는 vacuum manifold를 제거한 후 manifold base와 manifold top needle에 잔류된 모든 액체를 깨끗이 제거하였다. 표시이 된 volumetric flask를 vacuum manifold base에 장치한 후 manifold top과 column을 다시 덮었다. 8ml methanol로 column으로부터 용출된 용매와 용질을 흡인시킨 후 methanol을 사용하여 10ml를 준비했다.

⑤ 시료처리

Dram vial에 추출된 농축소변을 옮긴 다음 35°C 수욕상에서 액체가 거의 vial에 남아있지 않도록 액체질소를 이용하여 증발시킨 후에 각 vial 내의 침전물양을 측정하였다. 각 vial의 침전물의 농도가 DMSO 1ml당 20mg이 되도록 각 vial에 DMSO를 가한 후 -80°C deep freezer에 보관하였다.

ii) Kado assay의 실험과정

본 실험에 사용된 균주는 캘리포니아대학 생화학과의 Dr. Bruce Ames로부터 제공받았다. Salmonella microsuspension assay는 Kado 등²⁸⁾에 의한 방법에 따랐다. Oxoid Nutrient Broth (Oxoid Ltd; Hants, England)로 만든 master plate에서 1 colony를 취하여 20ml Oxoid Nutrient Broth에 접종시킨 후 약 14시간 배양시켜 농도를 $1-2 \times 10^9$ cells/ml로 만들었다. Cell을 $10,000 \times g$, 4°C에서 10분간 원심분리시켜 농축한 후 ice-cold phosphate-buffered saline (PBS, 0.15M, pH 7.4)에 재분산시켜 농도를 1×10^{10} cells/ml로 만들었다. 실험은 Arochlor 1254-induced CD-1 rat liver (1mg of protein per plate)에서 만든 S_9 를 사용하여 대사활성화(metabolic activation)를 시킨 후 진행하였다. 13×100 mm짜리 glass test tube를 사용하여 $100 \mu\text{l}$ 의 cell (1×10^9 cells), S_9 $100 \mu\text{l}$, 소변시료 $5 \mu\text{l}$ 를 취한 다음 37°C에서 90분간 배양시켰다. 시험관을 ice bath에 놓은 후 즉시 2 ml의 top agar를 glass test tube에 가한 후 약하게 진탕한 후 미리 표시된 VBME (Vogel-Bonner Medium E) plate에 붓고 고르게 퍼지게 하였다. Agar overlay가 굳은 후 plate를 거꾸로 뒤집어 37°C incubator에서 72시간 배양시킨 다음 automatic colony counter로 revertant 수를 세었다 (Fig. 1 참조). 본 실험에서 양성대조군으로 + S_9 상태에서는 sodium azide ($0.5 \mu\text{g}/\text{plate}$)를, - S_9 상태에서는 2-anthramine ($0.25 \mu\text{g}/\text{plate}$)를 사용하였다.

iii) Salmonella typhimurium plate incorporation test를 이용한 세척제의 변이원성검사

본 실험에서는 Ames 등⁴⁾에 의해 개발되어 Maron과 Ames³⁰⁾에 의해 보완된 방법을 사용하였

다. Oxoid Nutrient Broth(Oxoid Ltd; Hants England)로 만든 master plate에서 TA 100, TA 1535 한 colony씩을 취해 각각 20ml Oxoid Nutrient Broth에 접종시킨 후 약 14시간 배양시켜 농도를 $1-2 \times 10^{10}$ cells/ml로 만들었다. 13×100 mm test tube에 top agar 2ml를 가하고 S₉ 500μl, bacteria(TA 100, TA 1535) 100μl, 각 농도별로 세척제 100μl씩을 넣은 후 미리 각 농도별로 표시된 VBME plate에 붓고 고르게 퍼지게 하였다.

Agar overlay가 굳은 후 plate를 뒤집어 37°C incubator에서 72시간 배양한 후 자동집락계수기 (automatic colony counter)로 revertant 수를 세었다.

본 실험에서 양성대조군으로 사용한 물질은 +S₉ 상태에서는 sodium azide(0.5μg/plate), -S₉ 상태에서는 2-anthramine(3μg/plate)이었다(Table 1 참조).

Table 1. Concentration of Control Chemicals (μg/plate) for the Strains TA 100 and TA 1535.

	Kado Assay	Ames	S ₉
Sample amount	5μl	100μl	
Sodium azide	0.5μg	3μg	-
2-Anthramine	0.25μg	0.5μg	+

iv) 자료처리

Stead 등³¹⁾에 의해 개발된 통계분석모형을 이용하여 Ames test와 Kado test에 의해 나온 결과로 변이원성을 평가하였고 소변농축액을 이용한 Kado test 결과에 대해서는 추가로 t-test를 하여 실험군과 대조군의 revertant 수의 차이를 검정하였다. Stead model은 Bernstein model³²⁾는 달리 Poisson 분포에 근거를 둔 Non-linear model이다. 본 실험의 표본수가 작고 작업장 유기용제에 대한 기존의 자료가 드문 관계로 본 실험에서는 Stead 모형을 적용하였다.

성적 및 고찰

1. 대상작업장의 작업환경측정

제화공장 접착부서에서 근무하는 근로자들에게 개인시료채취기를 부착시켜 작업장의 공기를 채집하여 GC법으로 작업장 공기중의 유해성분을 3회 분석하여 얻은 결과는 Table 2와 같으며, 모든 측정치는 8시간 시간가중평균치로 환산한 것이다. 이들 접착부서에서 사용하는 접착제와 세척제를 수거하여 GC-MS법으로 성분을 분석한 후 (Table 3, Table 4 참조), Salmonella plate incorporation test로 변이원성을 조사하였다.

Table 2. Distribution of organic solvents in the air of investigated shoemaking factory by gas chromatography.

Compounds	Concentration (Min.-Max.)	TLV
Toluene	60-90 ppm	100ppm
Xylene	200-220ppm	100ppm
Cyclohexane	40-100ppm	500ppm
n-Hexane	10-12 ppm	50ppm
Methyl ethyl ketone	15-20 ppm	200ppm
Trichloroethylene	8-9 ppm	50ppm
Butylacetate	2-3 ppm	150ppm
Isopropyl alcohol	7-8 ppm	400ppm

Table 3. GC-MS profile of cleaning solution using cryofocusing trap and HP-UX system.

Compound	Molecular Weight	Molecular Formula
Hexanoic, 2-methyl-3-oxo-ethyl ester	172	C ₉ H ₁₆ O ₃
2-Propanone, 1-chloro-	92	C ₃ H ₅ Cl ₁₀
2-Propanone, 1, 3-dichloro-	125	C ₃ H ₄ Cl ₂₀
1, 4-Cyclohexadiene	80	C ₆ H ₈
Bi-2-cyclohexen	162	C ₁₂ H ₁₈

2. 유전독성 평가

Table 5는 본 실험에 사용된 실험군 및 대조군 근

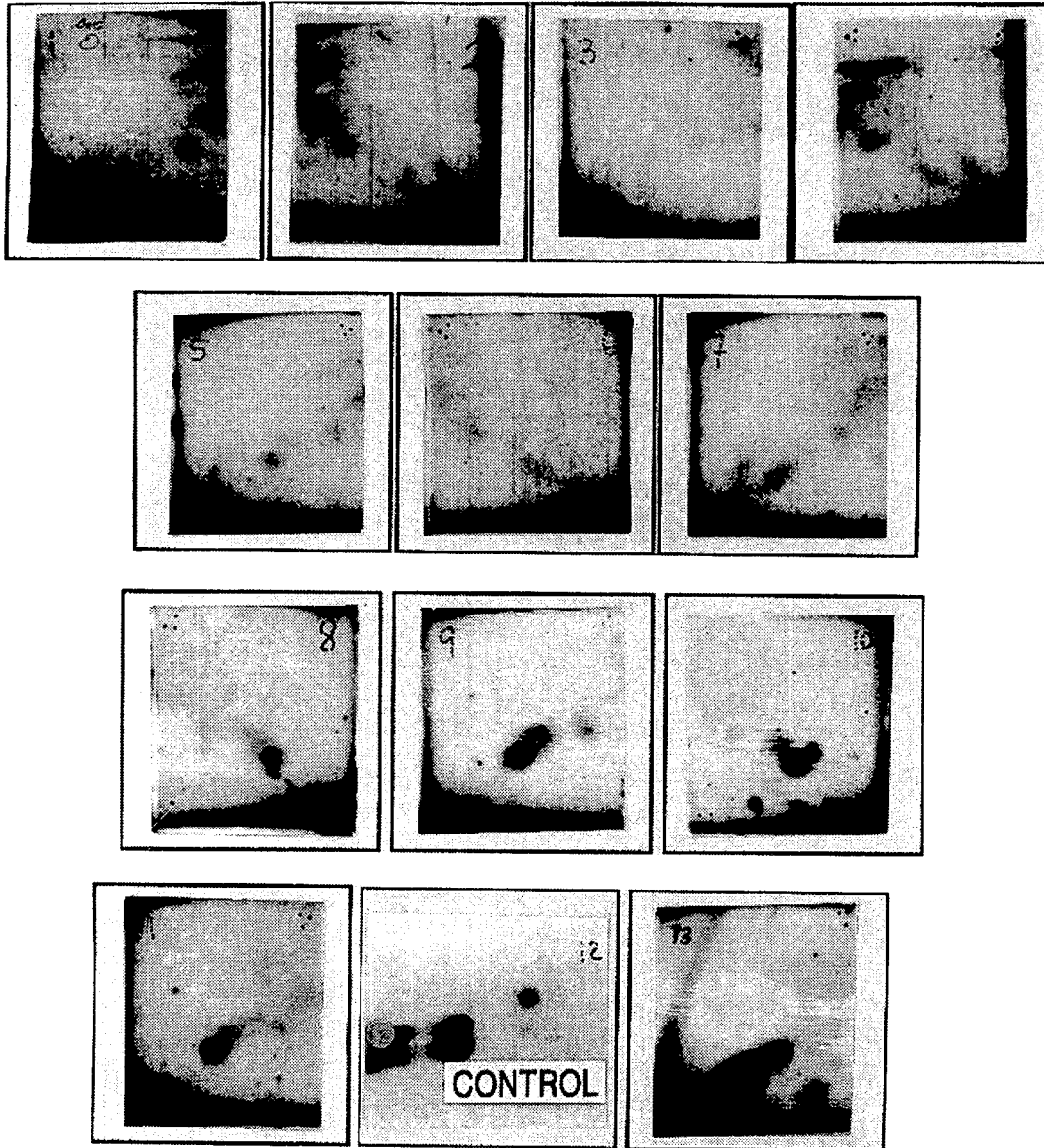


Fig. 2. Autoradiography of PEI-cellulose plates from ^{32}P -postlabelled peripheral blood DNA from shoemaking factory workers, control workers and skin DNA isolated from CD-1 mice treated with glue and glue cleaning solution. Autoradiography for TLC plates was at -80°C for 4 days. 1, 2, 3, 4: blood case, 5, 6, 7: blood control, 8: cleaner 6.25%, 9: cleaner 80%, 10: glue 6.25%, 11: glue 25%, 12: DMSO, 13: B(a)P

로자들의 혈액과 세척제를 도포한 mice의 등의 피부에서 분리한 DNA의 농도를 나타낸 것이다. DNA의 정제여부를 검사하기 위하여 spectrophotometer를 이용하여 Abs 260/Abs 280의 비를 구한 결과 모두 적합한 범위인 1.8-2.0 이내에 있

었다.

본 실험에서는 개인간의 오차를 줄이고자 각 군에 속하는 혈액에서 얻은 DNA를 섞어서 (pooled composite DNA sample) 사용하였다. Table 6 중의 blood 1은 Table 5 중의 case 1-1, case 1-2,

Table 4. GC-MS profile of glue using cryofocusing trap and HP-UX system.

Compound	Molecular Weight	Molecular Formula
Methyl ethyl ketone	72	C ₄ H ₈ O
Acetic acid, ethyl ester	88	C ₆ H ₈ O ₂
Cyclobutane	56	C ₄ H ₈
Cyclohexane	84	C ₆ H ₁₂
1, 4-Pentadiene, 2-methyl-	82	C ₆ H ₁₀
2-Butenoic acid, methyl ester	100	C ₈ H ₈ O ₂
Toluene	92	C ₇ H ₈
Benzene, chloro-	112	C ₆ H ₅ Cl
2-Propanoic acid, 2-methyl-, 2-hydroxyethyl ester	130	C ₈ H ₁₀ O ₃

case 1-3 및 case 1-4의 DNA를 pooling한 것을 의미한다. 이하의 blood 2, blood 3, blood 4도 마찬가지이다. blood 5는 Table 5 중의 control 1-1과 control 1-2를, blood 6는 control 2-1, control 2-2 및 control 2-3을, blood 7은 control 3-1과 control 3-2를 pooling한 것이다.

Table 6 중의 blood 1에서 blood 4는 유기용제 작업장 근로자의 혈액으로부터 추출한 DNA를 나타내며 blood 5에서 blood 7은 대조군의 혈액으로부터 추출한 DNA로서 blood 5는 female non-smoker, blood 6는 male heavy-smoker, blood 7은 male moderate-smoker의 혈액으로부터 DNA를 추출하여 pooling한 것이다. Skin 8, 9, 10, 11은 세척제와 접착제를 변이원성시험에서 가장 높은 변이원성을 보인 농도를 택하여 mice의 등에 바른 후 피부에서 DNA를 추출한 것으로서 skin 11의 경우는 접착제가 DMSO에 녹을 수 있는 최대농도가 25%인 관계로 세척제의 경우와 달리 최대농도가 낮았다. Skin 12는 음성대조군으로 mice의 등에 용매로 사용된 DMSO만을 발라서 DNA를 추출한 것이며, Skin 13은 양성대조군으로 B(a)P를 mice의 등에 발라 DNA를 추출한 것이다.

Fig. 2는 Table 6의 결과를 보여주는 autoradiogram이고 Fig. 3은 본 실험의 normal과 phos를 보여주는 것으로서 RAL값을 구하기 위하여 측정하였다.

Table 5. DNA concentration of peripheral blood isolated from shoemaking factory workers, control workers and CD-1 mice back skin treated with glue and glue cleaning solution.

Sample ID	DNA (mg/ml)	Description	Test sample
case 1-1	1.17	0-1YR*	blood
case 1-2	1.08	0-1YR	blood
case 1-3	0.87	0-1YR	blood
case 1-4	0.61	0-1YR	blood
case 2-1	1.33	1-3YR	blood
case 2-2	1.00	1-3YR	blood
case 2-3	1.19	1-3YR	blood
case 3-1	1.31	3-5YR	blood
case 3-2	0.95	3-5YR	blood
case 3-3	0.88	3-5YR	blood
case 4-1	0.64	5<YR	blood
case 4-2	0.57	5<YR	blood
case 4-3	1.39	5<YR	blood
control 1-1	1.28	non-smoker female	blood
control 1-2	1.28	non-smoker female	blood
control 2-1	0.66	heavy-smoker male	blood
control 2-2	1.12	heavy-smoker male	blood
control 2-3	1.20	heavy-smoker male	blood
control 3-1	0.93	smoker male	blood
control 3-2	1.07	smoker male	blood
cleaner 6.25%	1.24	cleaner 6.25%	mice back skin
cleaner 80%	1.04	cleaner 80%	mice back skin
glue 6.25%	1.35	glue 6.25%	mice back skin
glue 25%	1.41	glue 25%	mice back skin
DMSO	1.15	DMSO	mice back skin
B(a)P	1.18	B(a)P	mice back skin

*working duration, case: organic solvent workers, control: control workers.

Table 6에서 보면 혈액인 경우 유기용제 작업장의 근무년수에 따라 RAL 값이 용량반응관계로 상승하지 않았고, 대조군 근로자의 경우와 비교해도

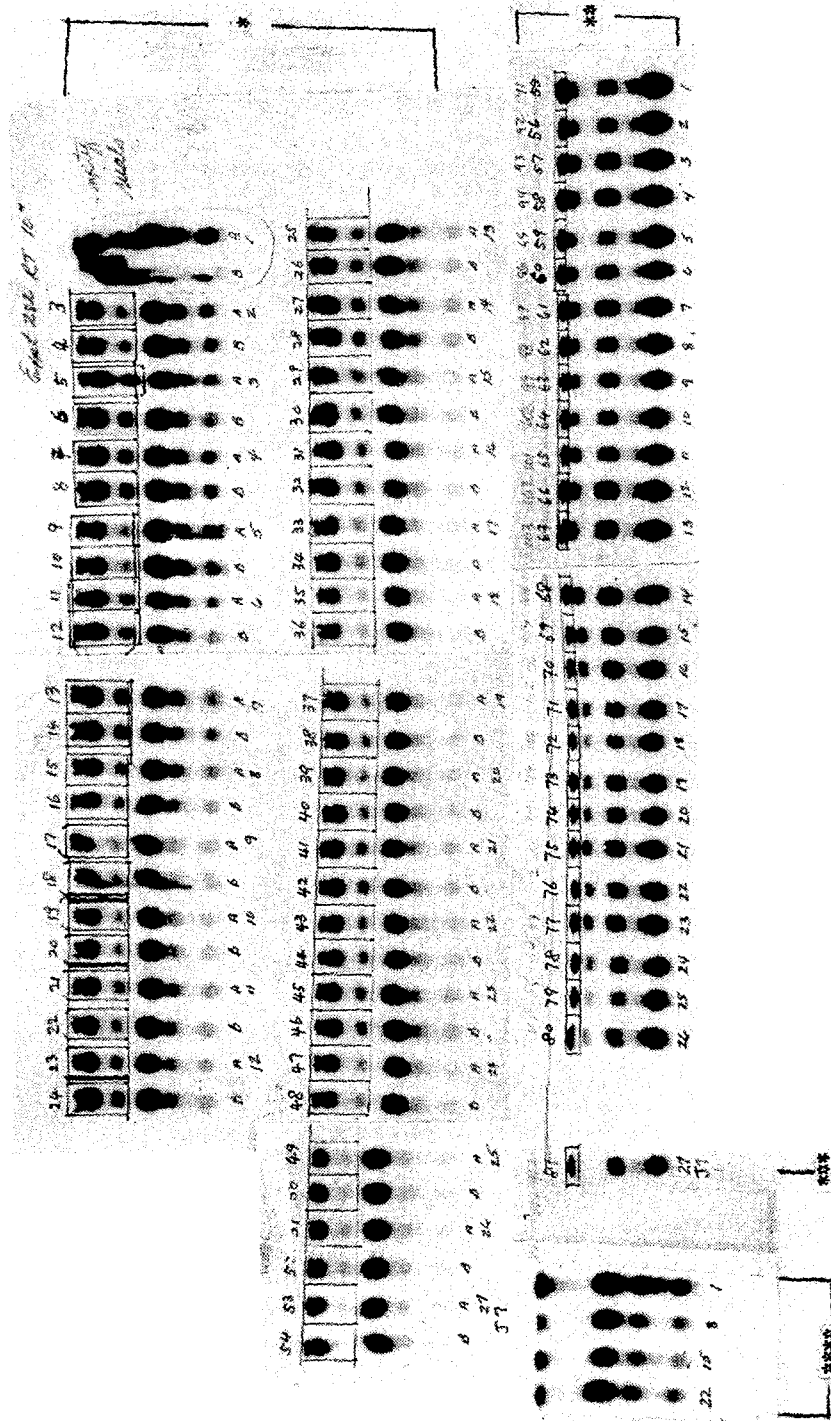


Fig. 3. Autoradiography of PEI-cellulose plates from ³²P-postlabelled peripheral blood DNA of shoemaking factory workers, control workers and skin DNA isolated from CD-1 mice treated with glue and glue cleaning solution. Autoradiography for TLC plates was at -80°C for 4 days. 1, 2, 3, 4, 14, 15, 16, 17: blood case, 5, 6, 7, 18, 19, 20: blood control, 8, 21: cleaner 80%, 10, 23: glue 6.25%, 11, 24: glue 25%, 12, 25: DMSO, 13, 26: B(a)P
 * normal, ** phos, ***standard for comparing with other experiment, **** for γ -ATP activity test

Table 6. Comparison of RAL in DNA from peripheral blood of shoemaking factory workers, control workers and from CD-1 mice skin treated with glue, glue cleaning solution, DMSO, and B(a)P.

Sample ID*	Description	RAL (10 ⁻⁸)
blood 1	0-1YR*	1.96
blood 2	1-3YR	9.47
blood 3	3-5YR	3.16
blood 4	5<YR	4.31
blood 5	non-smoker female	8.46
blood 6	heavy-smoker male	4.80
blood 7	smoker male	2.89
skin 8	cleaner 6.25%	5.73
skin 9	cleaner 80%	8.97
skin 10	glue 6.25%	11.40
skin 11	glue 25%	11.30
skin 12	DMSO	0.50
skin 13	B(a)P	15.90

*working duration

*blood 1, 2, 3, 4: blood DNA of organic solvent worker
 blood 5, 6, 7: blood DNA of control worker
 skin 8, 9, 10, 11, 12, 13: DNA of mice skin treated with cleaner, glue, DMSO (Dimethyl Sulfoxide), B(a)P.

유의한 차이가 없었다. 대조군 근로자의 경우 흡연에 따른 RAL 값의 차이도 없었다. 그러나 mice 피부에 세척제를 바른 경우에는 RAL 값이 용량반응관계로 증가함을 볼 수 있었다.

본 실험에서는 실험대상자들의 일반적인 특성인 성별, 연령, 신장, 체중, SGOT, Hb, 요당, 요단백 등을 조사하였으나 성별인 경우 본 실험의 대상자가 제화공장 근로자인 관계로 대부분 여성이었기 때문에 차이가 없었고 나머지 변수 역시 유의한 차이가 없어서 본 논문의 작성과정에서는 생략하였다.

3. 변이원성 평가

Fig. 4는 세척제의 변이원성을 보기 위해 Salmonella strain TA 100을 써서 S₉를 첨가하여 대사활성화(metabolic activation)를 시킨 조건에서 72시간 배양한 후 revertant 수를 count한 것이다. DMSO만 쓴 대조군(spontaneous, 여기에서는

세척제가 전혀 없는 용매 대조군을 칭함)에서 122.5±26.5revertants/plate가 나왔고, 양성대조군으로 2-anthramine을 사용한 경우 608.5±38.9 revertants/plate가 나와 Maron 등의 결과와 비교하여 볼 때 본 실험의 결과가 신뢰할 수 있는 범위에 있다고 하겠다. 세척제의 농도가 증가함에 따라 6.25%까지 계속 상승하다가 더 이상의 농도에서는 세척제로 인한 세포독성 때문에 revertant 수가 떨어짐을 볼 수 있었다. Stead model로 평가한 결과 p=0.0000으로 매우 유의한 변이원성을 나타내었다.

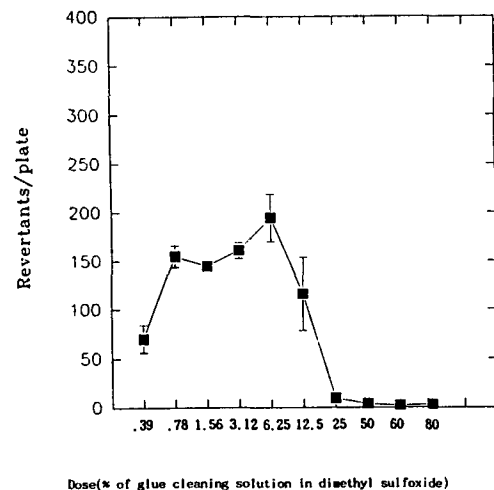


Fig. 4. Mutagenic activity of glue cleaning solution on Salmonella strain TA 100 with S₉. (p=0.0000 by Stead model analysis)

Spontaneous revertants averaged 122.5±26.5 colonies per plates. Revertants using 2-anthramine (0.5µg/plate) for a positive control averaged 608.5±38.9 colonies per plates for the assay.

Salmonella strain TA 100으로 S₉ 없이 실험한 결과도 세척제농도 6.25%에서 최대치를 보였고 역시 유의한 변이원성을 보였다(Fig. 5 참조).

대조군에서 104.0±5.7revertants/plate를 보여 Maron 등의 대조군(여기서는 DMSO도 넣지 않은 균을 의미하나 revertant 수의 차이는 없음)의 수치

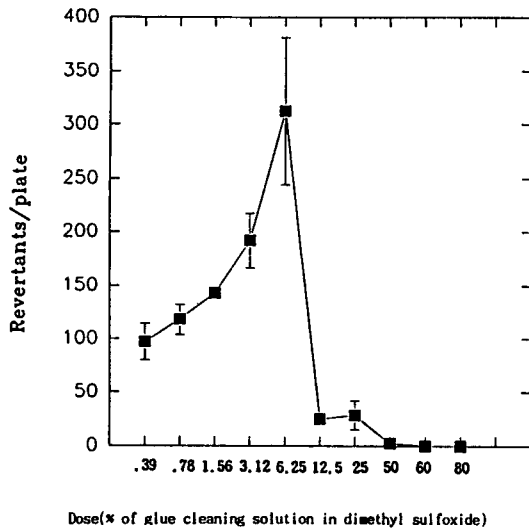


Fig. 5. Mutagenic activity of glue cleaning solution on Salmonella strain TA 100 without S₉. (p=0.0000 by Stead model analysis)

Spontaneous revertants averaged 104.0 ± 5.7 colonies per plates. Revertants using sodium azide ($3 \mu\text{g}/\text{plate}$) for a positive control averaged 892.0 ± 39.6 colonies per plates for the assay.

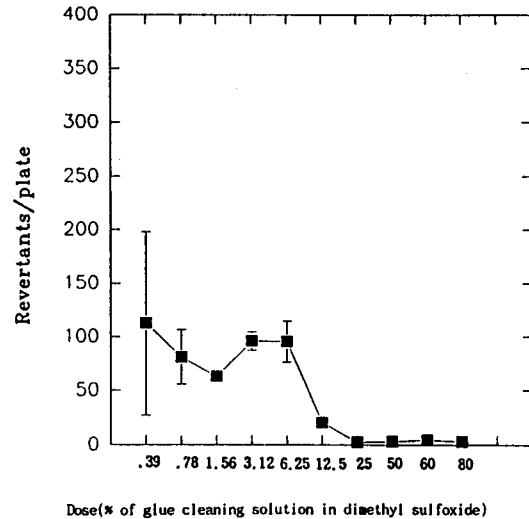


Fig. 6. Mutagenic activity of glue cleaning solution on Salmonella strain TA 1535 with S₉. (p=0.9950 by Stead model analysis)

Spontaneous revertants averaged 28.0 ± 1.4 colonies per plates. Revertants using 2-anthramine ($0.5 \mu\text{g}/\text{plate}$) for a positive control averaged 86.5 ± 0.7 colonies per plates for the assay.

인 120-200revertants/plate와 유의한 차이가 없었다.

Sodium azide를 사용한 양성대조군에서 892.0 ± 39.6 revertants/plate를 보여 Maron 등³³⁾의 sodium azide 사용시의 수치(500 이상)와 일치하였다.

S₉을 쓴 경우에는 대조군에서 28.0 ± 1.4 revertants/plate, 양성대조군으로 2-anthramine($3 \mu\text{g}/\text{plate}$)을 쓴 군에서 86.5 ± 0.7 revertants/plate를 보였고, S₉을 쓰지 않은 경우에는 대조군에서 16.5 ± 0.7 revertants/plate, 양성대조군으로 sodium azide를 쓴 군에서 540 ± 23.3 revertants/plate를 보였다. Fig. 6에서 한 가지 특이한 점은 dose 0.39%에서 6.25% 보다 revertant 수가 높게 나온 것이다. 세척제에서 유의한 변이원성을 발견하였기 때문에 이 세척제를 이용하여 작업을 하는 근로자(exposed case)와 소음작업장에서 근무하는 근로자(control)의 소변을 채취하여 Kado의 micro-suspension assay를 실시하였다.

실험군과 대조군의 소변농축액을 DMSO로 희석하여 100% (소변농축액 100%), 50% (소변농축액 50%+DMSO 50%), 10% (소변농축액 10%+DMSO 90%)의 농도로 만들어 각 농도당 3번의 실험을 반복하였다. DMSO만을 쓴 대조군에서는 134.0 ± 9.3 revertants/plate, 양성대조군으로 2-anthramine을 쓴 군에서는 1045.7 ± 196.1 revertants/plate가 나와 본 실험이 신뢰할 수 있는 범위에 있다고 하겠으나 Stead model로 분석한 결과, 실험군과 대조군 모두에서 유의한 변이원성을 발견하지 못했다. 추가로 t-test를 실시하여 실험군과 대조군간의 revertant 수를 비교하였으나 유의한 차이가 없었으며, 흡연자와 비흡연자간, 비흡연자만을 대상으로 한 실험군과 대조군간, 대조군만에서의 흡연자와 비흡연자간 모두에서 revertant 수의 차이를 볼 수 없었다.

참 고 문 헌

1. Harri, V., *et al.*, Application of mutagenicity Tests in Assessing Occupational Genotoxic Risk. *Mutagens in Our Environment*. pp. 433-442, Alan R. Liss, Inc., 150 Fifth Ave., New York, NY 10011, 1982.
2. Gupta, R.C., Nonrandom binding of the carcinogen N-hydroxy-2-acetyl-aminofluorene to repetitive sequences of rat liver DNA in vivo, *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*, 82, 979-983, 1985.
3. Perera, F.P., *Molecular Cancer Epidemiology, A New Tool in Cancer Prevention*, JNCI. Vol. 78, No. 5, 887-898, 1987.
4. Yamasaki, E. and Ames, B., Concentration of mutagens from urine by absorption with the nonpolar resin XAD-2: Cigarette smokers have mutagenic urine, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 74, 3555-3559, 1977.
5. Vaino, H., *et al.*, Biological monitoring in the identification of the cancer risk of individuals exposed to chemical carcinogens. *Scand. J. Work Environ. Health* 7, 241, 1981.
6. Durston, W.E. and Ames, B.N., A simple method for the detection of mutagens in urine; Studies with the carcinogen 2-acetylaminofluorene. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 71, 737, 1974.
7. Falck, K., Grohn, P., Sorsa, M., Vainio, H., Heinonen, E. and Holsti, L.R., Mutagenicity in urine of nurses handling cytostatic drugs. *Lancet* 1, 1250, 1979.
8. Falck, K., Sorsa, M. and Vainio, H., and Kilpikari, I., Mutagenicity in urine of workers in rubber industry. *Mutat. Res.*, 79, 45-52, 1980.
9. Vaino, H., Sorsa, M. and Falck, K., Bacterial urinary assay in monitoring exposure to mutagens and carcinogens, in: A. Berlin, M. Draper, K. Helmminki and H. Vaino (eds.), *Monitoring Human Exposure to Carcinogenic and Mutagenic Agents*, IARC Sci. Publ., Vol. 59, IARC, Lyon, pp. 247-258, 1984.
10. Jeffe, R.L., Nicholson, W.J. and Garro, A.J., Urinary mutagen levels in smokers, *Cancer Lett.*, 20, 37-42, 1983.
11. Kriebel, D., Henry, J., Gold, J.C., Bronsdon, A. and Commoner, B., The mutagenicity of cigarette smokers' urine. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 6, 157-169, 1985.
12. Putzrath, R.M., Langley, D. and Eisenstadt, E., Analysis of mutagenic activity in cigarette smokers' urine by high performance liquid chromatography, *Mutat. Res.*, 85, 97-108, 1981.
13. Dolara, P., Mazzaoli, S., Rosi, D., Buiotti, E., Baccetti, G., Tuchi, A. and Vanucci, J., Exposure to carcinogenic chemicals and smoking increases urinary excretion of mutagens in humans, *J. Toxicol. Environ. Health*, 8, 95-103, 1981.
14. Reico, L., Enoch, H., Hannon, M.A. and Hill, R. H., Application of urine mutagenicity to monitor coal liquefaction workers, *Mutat Res.*, 136, 201-207, 1984.
15. Sorsa, M., Falck, K., Paakkanen, M. and Vaino, H., Genotoxic hazards in the rubber industry. *Scand. J. Work. Environ. Health*, 9, 103-107, 1983.
16. Speck, W.T., Stein, A.B. and Rosenkranz, H.S., Mutagenicity of metronidazole: Presence of several active metabolites in human urine, *J. Natl. Cancer Inst.*, 56, 283-284, 1976.
17. Baker, R., Arlauskas, A., Bonin, A. and Angus, D., Determination of mutagenic activity in human urine following fried pork or bacon meals, *Cancer Lett.*, 16, 81-89, 1982.
18. Sasson, J.M., Coleman, D.T., LaVoie, E.J., Hoffman, D. and Wynder, E.L., Mutagens in human urine: Effects of cigarette smoking and diet, *Mutat. Res.*, 158, 149-157, 1985.

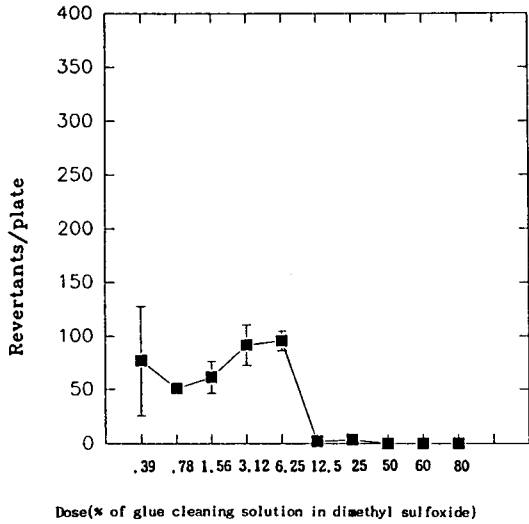


Fig. 7. Mutagenic activity of glue cleaning solution on Salmonella strain TA 1535 without S_9 . ($p=0.0000$ by Stead model analysis)

Spontaneous revertants averaged 16.5 ± 0.7 colonies per plates. Revertants using sodium azide ($3 \mu\text{g}/\text{plate}$) for a positive control averaged 540.5 ± 23.3 colonies per plates for the assay.

결 론

1. 대상작업장의 작업환경측정

제화공장 접착부서에서 근무하는 근로자들에게 개인용 공기채취기를 부착시켜 작업장 공기중의 유기용제를 GC법으로 분석한 결과, toluene, xylene, cyclohexane, n-hexane, methyl ethyl ketone, trichloroethylene, butylacetate, isopropyl alcohol이 발견되었으나, xylene을 제외하고는 모두가 허용기준치 이하였다. 한편, 접착제 및 세척제의 성분을 GC-MS로 분석한 결과 toluene, methyl ethyl ketone 등이 발견되었으나 검출물질을 대상으로 문헌조사한 결과 변이원성은 발견되지 않았다.

2. ^{32}P -postlabelling법에 의한 유전독성 평가

유기용제 작업장 근로자 및 대조군의 혈액을 이용하여 얻은 autoradiogram에서 보듯이 방사성 활성

부분은 명확하였고 RAL 값은 $1.96-9.47(10^{-8})$ 이었다. 그러나 폭로군과 대조군간의 RAL 값에는 유의한 차이가 없었다.

Mouse의 피부에 세척제와 접착제를 topical application하여서 얻은 autoradiogram도 혈액과 마찬가지로 방사성활성부분은 명확하였으며 RAL 값은 $5.73-11.40(10^{-8})$ 이었다. 특히 세척제에서는 RAL 값이 용량반응 관계를 보였다($P < 0.01$).

3. 변이원성 평가

접착제 및 세척제를 TA 100과 TA 1535를 사용하여 $+S_9$, $-S_9$ 상태에서 실험한 결과 세척제만 TA 100에서 $+S_9$, $-S_9$ 순으로 유의한 변이원성을 보였고 ($p=0.0000$ by Stead model), TA 1535에서는 $-S_9$ 상태에서만 유의한 변이원성을 보였다 ($p=0.0000$ by Stead model).

실험군과 대조군의 소변농축액을 이용하여 TA 100으로 $+S_9$ 상태에서 Kado assay를 한 후 Stead model을 이용하여 분석한 결과, 양군 모두에서 유의한 변이원성을 발견하지 못했으며 t-test를 이용하여 실험군과 대조군의 revertant 수 및 흡연여부에 따른 revertant 수의 차이를 검정하였으나 유의하지 않았다.

이상의 실험 결과에서 본 바와 같이, 제화공장 근로자들은 유전독성물질에 노출되어 있을 가능성이 있다. 그러나 TA 100 및 TA 1535 모두에서 S_9 이 없는 경우에 더 큰 변이원성을 보였고, 근로자의 소변에서는 변이원성을 발견하지 못한 것으로 보아 본 실험에 사용한 세척제는 자체로는 변이원성이 있으나 체내에서 대사활성화를 거치는 동안 변이원성이 떨어진다고 볼 수 있으며, 이로 인해 근로자의 소변에서 변이원성을 발견하지 못한 것으로 보인다. 따라서 이들 근로자들의 유전독성물질 노출여부를 위한 집단검사법으로 소변을 사용할 경우 해석상 많은 주의가 요망된다고 하겠다.

한편 ^{32}P -postlabelling법을 복합유기용제 노출로 인한 근로자의 유전독성 평가를 위한 집단검사법으로 직접 사용하기에는 아직도 많은 연구가 필요하다고 하겠다.

19. Gletten, F., Weeks, V. and Brusick, D., In vitro metabolic activation of chemical mutagens, I. Development of an in vitro mutagenicity assay using liver microsomal enzymes for the activation of dimethylnitrosamine to a mutagen, *Mutat. Res.*, 28, 113-122, 1975.
20. Green, M.H.L., Bridges, B.A., Rogers, M., Horspool, G., Muriel, W.J., Bridges, J.W. and Fry, J. R., Mutagen screening by simplified bacterial fluctuation test: Use of microsomal preparations and whole liver cells for metabolic activation, *Mutat. Res.*, 48, 287-294, 1977.
21. Mallings, H.V., Dimethylnitrosamine: Formation of mutagenic compounds by interaction with mouse liver microsomes, *Mutat. Res.*, 13, 425-429, 1971.
22. Mitchen, I. deG., Microbial assays for mutagenicity: A modified liquid culture method compared to the agar plate system for precision and sensitivity, *Mutat. Res.*, 54, 1-16, 1978.
23. Nagao, M., Yahagi, T., Seino, Y., Sugimura, T. and Ito, N., Mutagenicities of quinoline and its derivatives, *Mutat. Res.*, 42, 335-342, 1977.
24. Sugimura, T. and Nagao, M. Modification of mutagenic activity, in: F. de Serres and A. Hollaender (Eds.), *Chemical Mutagens. Principles and Methods for Their Detection*, Plenum, New York, pp. 41-60, 1980.
25. Unger, J. and Guttenplan, J.B., Kinetics of benzo[a]pyrene induced mutagenesis in a highly sensitive Salmonella/microsome assay, *Mutat. Res.*, 77, 221-228, 1980.
26. Yahagi, T., Nagao, T.M., Seino, Y., Matsu-shima, T., Sugimura, T. and Okada, M., Mutagenicities of N-nitrosamines on Salmonella, *Mutat. Res.*, 48, 121-129, 1977.
27. Hulks, B.S., Wilcosky, T.C., Biological markers in epidemiologic research. *Arch. Environ. Health*, 43, 83-89, 1988.
28. Kado, N., Langley, D. and Eisenstadt, Increased sensitivity for detecting mutagens in human urine. *Mutat., Res.* 121, 25-32, 1983.
29. Randerath, K., Reddy, M.V. and Gupta, R.C., ³²P-labelling test for DNA damage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 6126-6129, 1981.
30. Maron, D. and Ames, B., Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res.*, 113, 173-215, 1983.
31. Stead, A., Hasselblad, V., Creason, J. and Claxton, L., Modeling the Ames test, *Mutat. Res.*, 85, 13-27, 1981.
32. Bernstein, L., Kaldor, J., McCann, J. and Pike, M., An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the Salmonella test *Mutat. Res.*, 97, 267-281, 1982.
33. Maron, D. and Ames, B., Revised method for the Salmonella mutagenicity test, *Mutat. Res.*, 113, 173-212, 1983.