

인체에서의 초생체 염색법을 이용한 제대혈내 소핵 출현 빈도

박혜경¹ · 이은일¹ · 류재천² · 김해준^{1*}

¹고려대학교 의과대학 예방의학교실 및 환경의학연구소, ²한국과학기술연구원

Micronucleus Frequencies in Human Umbilical Cord Blood by the Supravital Staining Method

Hye-kyung Park¹, Eunil Lee¹, Jae-Chun Ryu² and Hae-Joon Kim^{1*}

Department of Preventive Medicine, School of Medicine and Institute for Environmental Health, Medical Science Research Center, Korea University, 5 Anamdong Sungbukku, Seoul 136-701 Korea
Toxicology Laboratory, Korea Institute of Science and Technology, PO Box 131, Seoul 130-650, Korea

(Received November 15, 2002 / Accepted December 20, 2002)

ABSTRACT : This study was conducted to quantify of micronucleus frequencies in human umbilical cord blood by supravital staining method with acridine orange, and to find some factors that affected on micronucleus frequencies in humans. In this study, we used umbilical cord blood of new born infants that have sufficient reticulocytes compared with adult peripheral blood. The cord bloods were taken after childbirth from 60 normal infants in industrial and coastal region in Korea. The total of 3 μ l cord blood was applied to slide coated with acridine orange, and micronuclei were observed under fluorescent microscopy. Demographic factors and independent variables were collected from mothers by questionnaire. The frequencies of micronuclei in umbilical cord blood of new born infants were 0-5 per 2,000 reticulocytes by supravital staining method, and mean value and standard deviation were 1.75 ± 0.97 . There were no significant difference by the regions, smoking habits of father or mother. However, age of mother showed significant positive correlation with frequencies of micronuclei ($p < 0.05$). Smoking at home by fathers also was found as a significant variable by multiple regression analysis. Therefore, further studies would be needed for genotoxicological evaluation of new born infants by micronuclei test using supravital staining method.

Keywords : acridine orange, micronuclei, umbilical cord blood, smoking

서 론

유전 독성학의 주된 관심 분야는 변이원성의 과정에 대한 것으로, 넓은 의미에서의 변이원성이란 DNA 손상의 유발, 하나 또는 몇 개의 DNA 염기쌍의 변화(유전자 돌연변이), 염색체 구조의 변화(chromosome aberrations) 및 염색체 수의 변화와 같은 모든 종류의 유전적 변이까지를 포함한다(Hoffman, 1992). 아직까지 염색체검사 결과와 발암 위험성과의 관련성을 명확히 설명할 만한 연구 결과는 축적되어 있지 않으나 염색체 손상 빈도의 조사를 통한 염색체 검사는 유해물질의 폭로와 반응 정도를 평가하는데 많이 이용되고 있다.

세포유전학적 독성 검사법으로는 염색체 구조이상 검사

(chromosomal aberration), 자매염색분체 교환 검사(sister chromatid exchange), 단세포전기영동법(comet assay), 그리고 소핵(micronucleus)의 발현 빈도를 관찰하는 방법 등이 있다(Schmid, 1975; Au, 1991; Bolognesi 등, 1997; 나중호 등, 1999; Tice 등, 2000). 이러한 유전독성 검사는 유전 독성물질의 폭로 및 생체 효과 정도를 평가하는 생물학적 표지자로 이용되고 있으며, 실제 직업적으로 유해 환경에 노출되고 있는 근로자들에 있어서 저농도 유해물질의 폭로 평가에 생물학적 표지자를 활용하려는 시도가 활발히 이루어지고 있다(Hulka 등, 1990; WHO, 1993; Gochfeld, 1995; Moller 등, 2000).

이중 소핵시험법은 적혈구의 분화과정 중에 형성되는 비정상적인 염색체 성분인 소핵의 유도를 지표로 하는 것이다. 소핵(micronucleus)은 유핵의 적혈구 모세포로부터 무핵의 성숙 적혈구가 분화되는 과정에서 자연발생적으로 또는

*To whom correspondence should be addressed

clastogen에 의해 염색체 절단이나 세포분열의 기작 이상으로 형성된 염색체 조각이거나, 염색체가 세포분열의 telophase 시기에 양극으로 끌려가지 못함으로 형성된다. 소핵의 출현 빈도를 평가하는 것은 기관 특징적인 발암물질이나 변이원성을 가진 물질에 노출된 동물 또는 인체 세포에서의 유전독성적 손상을 확인하기 위한 방법으로 사용되어질 수 있다(Belicin 등, 1995). 또한 소핵 시험법은 한번 생성된 소핵이 장기간 세포 내에 존재하게 되어 관찰 가능한 시간적 여유가 있게 되며, 해당 소견을 쉽게 확인할 수 있고, 다른 검사 방법들에 비해서 판독에 세포유전학적인 전문적 소양이 크게 요구되지 않는다는 장점이 있다.

지금까지의 소핵시험법은 인간 또는 동물의 말초혈액내의 임파구를 배양하거나 골수 또는 말초혈액의 다염성 적혈구에 Giemsa 염색법을 적용하는 방법 등 2가지 방법이 주로 이용되어 왔으며, 인체를 대상으로 한 실험에서는 주로 말초혈액내의 임파구 배양을 이용한 방법이 사용되었다. 그러나 실제 Giemsa 염색에 의한 광학현미경 하에서의 소핵의 구별의 어려움, 숙련된 판독을 위한 장기간의 훈련 등 어느 정도의 단점이 있었던 것이 현실이다. 그러나 1990년 Hayashi 등에 의해 동물의 말초혈액 내의 망상적혈구를 표적으로 하여 acridine orange로 형광염색하는 초생체 염색법이 소개되어 이런 문제점을 보완할 수 있게 되었다. 특히 동물실험의 경우, 골수세포 대신 말초혈액세포로의 대체 유용성이 실험적 검증을 통하여 입증되었다(CSGMT, 1992).

말초혈액내의 망상적혈구를 이용한 초생체 염색법의 또 다른 장점으로는 세포군이 일정하고 규칙적이어서 관찰이 쉽고 빠르며, 관찰과정이 자동화될 수 있다는 것이다. 또한 동물 실험시 혈액을 반복적으로 채혈할 수 있기 때문에 예비실험을 별도로 하지 않고도 동일 개체내에서 최적 소핵유도시간을 결정할 수 있다(Hayashi 등, 1990). Acridine orange를 이용한 초생체 염색법은 이런 여러 장점들로 인해 OECD Guideline에 등재되기 위해 국제적인 의견이 수렴되고 있다(류재천 등, 1999).

그러나 인간의 말초혈액에 대하여 초생체 염색법을 적용한 연구는 찾아볼 수 없었다. 성인의 말초혈액내의 망상적혈구 비율이 0.5-1.5% 정도(Wyngaarden과 Smith, 1985)로 소핵 시험법을 수행하기에는 매우 희박해 2,000개의 망상적혈구를 관찰하기에는 많은 어려움이 있기 때문인 것으로 생각한다. 그러나 신생아 제대혈에는 충분한 양의 망상적혈구가 있어 초생체 염색법을 적용한 연구가 가능하다. 따라서 본 연구는 신생아 제대혈을 이용하여 초생체 염색법을 적용하여 신생아 제대혈 내의 소핵 출현과 흡연, 환경 오염, 산모의 나이 등의 여러 요인들과의 관련성을 평가하여, 신생아 제대혈을 이용한 초생체 염색법의 적절성을 평가하고자 하였다.

연구방법

연구 대상

(1) 연구 대상 지역의 선정

환경적인 요소, 특히 대기오염 정도가 제대혈 내 소핵 출현 여부에 영향을 미칠 수 있는지 확인하기 위하여 2개의 연구 대상 병원 중 한 곳은 공단지역 내에 위치하는 병원을, 다른 한 곳은 공업지역이 아닌 해안도시의 1개 산부인과 의원으로 선정하였다.

(2) 설문 조사

2개 병·의원에서 분만을 시행한 산모들에 대해 산모의 나이, 임신 기간, 신생아의 출생시 체중 등의 일반 산과적 사항과 임신 기간 중 거주했던 지역, 산모의 음주, 흡연 및 기타 과거력과 신생아의 아버지들의 흡연력 및 실내 흡연 여부에 대해 해당 병·의원의 분만실 간호사들에 의해 설문 조사를 실시하였다. 설문조사 시 제대혈 채취에 대한 사전 동의를 얻었으며, 정상아 출생시 제대혈 2 ml를 취한다는 것과 출생아에게 어떠한 고통이나 불이익이 없음을 고지하였다.

(3) 제대혈의 채취 및 연구대상

선정된 2개의 해당 병·의원에서 정상적으로 분만된 신생아 각 30명에 대해 분만 직후, 제대를 혈관 검사로 절찰한 상태의 제대혈을 5 ml 주사기를 이용하여 헤파린으로 처리된 유리관에 무균적인 방법으로 채취하였다. 제대혈 채취 대상은 출생시 발견할 수 있는 외형상의 선천성 기형을 갖고 있지 않은 정상아로 하였다.

연구대상 지역인 A, B 지역에서 각각 30례의 제대혈을 채혈하고, 대상자에 대한 설문조사를 실시한 결과, 설문 응답 결과에 무응답 항목으로 분석에 부적합한 4례를 제외한 56례를 분석 대상으로 하였다.

(4) 주거지별 환경오염자료

환경부 대기질 자동측정망 자료를 이용하여 해당 병·의원이 위치한 지역의 대기환경오염 정도를 파악하였다.

실험방법

(1) 일반 혈액학적 검사 및 망상적혈구수 계수

Ca-EDTA가 처리된 시험관을 준비하여, 분만과정 중에 혈관검자로 결한 제대로부터 5 ml 주사기를 이용하여 제대혈 2 ml를 별도로 채취한 후, 혈구자동분석기를 이용하여 제대혈내 혈구 구성과 망상적혈구의 백분율을 검사하였다.

(2) acridine orange를 코팅시킨 슬라이드의 제작

섭씨 70도에서 미리 가열시킨 슬라이드용 유리판의 중앙에 증류수에 1 mg/ml 농도로 녹인 acridine orange 용액 10 µl를 떨어뜨린 후 유리막대로 균일하게 도말하여 자연 건조시킨 후, 밀봉하여 사용할 때까지 차광된 상온에서 보관하였다.

(3) 표본제작

채취한 제대혈 3µl를 취하여 미리 준비된 acridine orange로 코팅시킨 슬라이드용 유리판에 떨어뜨린 후 커버 글라스로 덮은 다음, 2시간 동안 4°C에 방치하여 세포와 acridine orange가 충분히 반응하게 하였으며, 현미경 검경시 까지 -20°C 냉동고에 보관하였다.

(4) 소핵 관찰

형광현미경으로 초생체 염색법을 이용한 슬라이드를 관찰 시 blue excitation과 yellow에서 orange barrier 필터가 혼합된 필터를 사용하였다. 현미경의 배율은 10×100배에서 관찰하며, I형에서 III형까지의 망상적혈구 2,000개중 소핵이 있는 망상적혈구의 갯수를 측정하였다. 두 장의 슬라이드를 제작하여 각 2,000개씩의 망상적혈구를 형광현미경 하에서 검경하여 소핵의 산술 평균값을 구하였다.

자료처리

자료의 분석은 PC용 SAS v6.12를 이용하였다. t-test를 이용하여 2개의 대상 병?원이 위치한 지역에 대한 환경부 대기질 자동측정망 자료중 TSP, O₃, NO₂, SO₂ 등이 지역적 차이를 보이는지 확인하였다. 제대혈을 채취한 대상 임신부 및 신생아의 체중, 일반 혈액학적 분석 소견 및 기타 특성에 대한 자료의 단변량 검정 결과를 제시하고, 각 시료로부터 얻은 망상적혈구내 소핵 출현 수를 계수하여 그 분포성의 통계학적 검정을 실시하였다. 소핵 출현 정도의 구간 평균치 비교와 상관분석을 통하여 소핵 출현 정도에 영향을

미치는 요소들을 확인하였으며, 다요인간 교호작용의 여부를 판단하기 위해 다변량 회귀분석을 실시하였다.

연구결과

연구 대상 두지역의 대기오염 농도는 환경부 대기질 농도 측정 결과를 이용하였으며, 매월 평균 농도의 평균값을 연 평균 농도로 이용하였다. 대기중 SO₂와 NO₂, CO, 대기중 총 부유분진(TSP: total suspended particulates) 등의 연평균 농도가 A 지역이 B 지역 보다 3-4배 정도 높은 수치를 나타내었고 그 차이는 통계적으로 유의하였다(p<0.0005). 오존의 경우는 A지역이 높았지만 통계적으로 유의하지는 않았다(Table 1).

대상 지역별 연구 대상 산모 및 신생아의 일반적 특성은 서로 유사하였으나 신생아 출생시 체중이 A지역보다 B지역이 통계적으로 유의하게 높았다. 일반혈액학적 소견에서는 A 지역의 제대혈 내 적혈구수가 B 지역보다 통계적으로 유의하게 높았으며, 헤마토크리트 수치도 A지역이 유의하게 높았다(Table 2). 두 지역의 분만형태, 산모의 흡연상태, 아기 아버지의 흡연 여부, 임신 중 음주, 산모의 직업 여부 등도 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 3).

두 지역에서의 제대혈 내 소핵 출현 빈도는 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 4). 소핵의 출현과 관련될 수 있는 산모의 연령, 임신기간, 출생시 체중, 혈액소, 아버지의 실내 흡연량 등과의 상관관계를 구한 결과, 산모의 연령이 증가할

Table 1. Comparison of annual air pollution status between region A and B

Variables	Region A	Region B	p-value
SO ₂ (ppm)	0.009±0.002 (0.007-0.012) ^a	0.003±0.001 (0.001-0.005)	0.0000
O ₃ (ppm)	0.023±0.005 (0.013-0.030)	0.018±0.008 (0.007-0.032)	0.0958
NO ₂ (ppm)	0.027±0.010 (0.007-0.039)	0.010±0.005 (0.003-0.020)	0.0002
CO (ppm)	1.208±0.392 (0.8-2.0)	0.271±0.092 (0.1-0.4)	0.0000
TSP (µg/m ³)	80.9±23.1 (40.0-114.0)	25.0±7.5 (17.0-37.0)	0.0000

^aMean±S.D.(Range)

#This data was derived from Ministry of Environment, 1998

Table 2. General characteristics of subjects

Variables (unit)	Region A (N=26)	Region B (N=28)	p-value
Age of Mother(year)	28.3±4.48 (21-39) ^a	30.0±3.89 (21-39)	0.1522
Duration of Pregnancy (month)	38.0±1.92 (32.3-41.2)	38.9±1.05 (37.1-40.6)	0.0604
Weight at Birth (kg)	2.88±0.44 (1.9-3.47)	3.30±0.34 (2.54-4.10)	0.0003
RBC (10 ⁶ /µl)	4.28±0.51 (3.36-5.25)	3.87±0.57 (2.75-4.69)	0.0105
Hb (gm/dl)	15.3±1.69 (12.1-18.1)	14.3±1.87 (10.5-16.8)	0.0592
Hct(%)	46.7±5.60 (36.7-59.0)	42.8±5.76 (30.8-50.5)	0.0184
WBC (10 ³ /µl)	7.86±3.30 (2.7-17.7)	7.96±3.33 (2.0-14.1)	0.9190
Reticulocyte(%)	3.88±1.52 (2.3-7.2)	3.51±1.52 (1.5-8.0)	0.3918

^aMean±S.D. (Range)

Table 3. Comparisons of various risk factors on pregnancy for region A and B

Variables		Region A	Region B	Total	p-value
Type of Delivery	Vaginal	14 (53.8) ^a	15 (53.6)	29 (53.7)	0.354
	C-section	12 (46.2)	13 (46.4)	25 (46.3)	
Smoking of Mother	Yes	2 (7.7)	1 (3.6)	3 (5.6)	0.509
	No	24 (92.3)	27 (96.4)	51 (94.4)	
Smoking of Father	Yes	17 (73.9)	23 (82.1)	40 (78.4)	0.477
	No	6 (26.1)	5 (17.9)	11 (21.6)	
Smoking at Home	Yes	5 (25.0)	14 (51.9)	19 (40.4)	0.064
	No	15 (75.0)	13 (48.1)	28 (59.6)	
Drinking of Mother	Yes	8 (30.8)	3 (10.7)	11 (20.4)	0.068
	No	18 (69.2)	25 (89.3)	43 (79.6)	
Job of Mother	Yes	7 (26.9)	5 (17.9)	12 (22.2)	0.423
	No	19 (73.1)	23 (82.1)	42 (77.8)	

^a No.(%)**Table 4.** Comparison of micronucleus frequencies between region A and B

	Total	Region A	Region B	p-value
Frequencies of Micronuclei	1.75±0.97 (0-5) ^a	1.80±0.82 (0.5-4)	1.70±1.12 (0-5)	0.6840

*Mean±S.D (Range)

Table 5. Correlation analysis between micronucleus frequencies and relating factors

	Age of Mother	Duration of Pregnancy	Birth Weight	Hematocrit	Smoking at Home
r	0.2776	-0.1756	-0.0612	0.2011	0.2364
p-value	0.0486	0.2042	0.6667	0.1615	0.1096

Table 6. Multiple regressin analysis between micronucleus frequency and relating factors

Variables	Parameter Estimate	p-value
Intercept	3.2019	0.5857
Age of mother	0.1175	0.0217
Duration of Pregnancy	-0.2269	0.1688
Birth Weight	0.3834	0.5361
Hematocrit	0.0496	0.0846
Smoking at Home	0.9400	0.0067
R ²	0.3772	0.0074

수록 소핵 출현 정도가 통계적으로 유의하게 증가하는 것으로 나타났다($r=0.2776$, $p=0.0486$)(Table 5). 여러 변수들간의 영향력을 통제하기 위해 다변량분석을 하였는데, 이때 실내 흡연은 흡연 여부로 분석하였다. 그 결과 산모의 연령과 실내 흡연여부가 통계적으로 유의한 변수로 나타났다(Table 6).

고 찰

말초혈액내 임파구를 이용하는 소핵시험법은 1985년 Fenech와 Morley에 의해 고안되어 인체에 대한 cytokinesis-block 기법을 적용한 소핵시험법으로 생체 내와 생체 외 실험

모두에서 널리 사용되어 왔다(Fenech와 Morley, 1985a; Surralles과 Natarajan, 1997). 또한 다염성 적혈구를 이용한 소핵시험법은 1975년 Schmid에 의해 개발되어 소개된 이후, 화학물질에 의한 변이원성을 평가하는 시험법으로 전세계적으로 이용되어 오고 있다. 이와 같이 기존의 전통적인 소핵 시험법에 있어서는 분열이 중지된 임파구나 골수 또는 말초 혈액내의 무핵의 미성숙 적혈구인 다염성 적혈구를 표적으로 하여 소핵을 함유한 세포의 출현 빈도로서 변이원성을 판정하였다. 그러나 Giemsa 염색에 의한 소핵을 판정하는 것은 다른 구조물과의 구별에 있어서의 어려움, 숙련된 판독을 위한 장기간의 훈련 등 단점이 있었던 것이 현실이다.

Hayashi 등(1990)에 의해 동물의 말초혈액 내의 망상적혈구를 표적으로 하여 acridine orange로 형광염색을 실시하는 초생체 염색법이 소개된 후, 특히 동물실험의 경우에서 골수 세포 대신 말초혈액세포로의 대체 유용성이 실험적 검증을 통하여 입증되어 왔다(CSGMT, 1992). 이러한 초생체 염색법은 기존의 다염성적혈구를 이용한 Giemsa 염색방법과 비교할 만한 민감도를 가지고 있고, 말초혈액내 소핵의 출현 정도가 골수내 적혈구를 대상으로 했을 때의 소핵 출현 정도를 반영하고 있으며, 실험 결과의 재현성이 우수하다는 결론을 얻었다(CSGMT, 1992).

골수내 다염성 적혈구와 말초혈액내 망상적혈구의 빈도를 정확하게 비교하는 것은 쉽지 않으며, Hayashi 등의 연구자들은 크기가 큰 소핵을 소유하는 세포들은 혈구 생성과정을 거치면서 말초혈액내로 들어오기 전 제거된다고도 하였다. 그러나 말초혈액내의 망상적혈구 빈도는 대체적으로 골수내 다염성 적혈구에서 나타나는 소핵의 빈도를 잘 반영하는 것으로 알려져 있다(CSGMT, 1992).

말초혈액내 망상적혈구를 acridine orange를 이용하여 형광염색하는 경우, 관찰 대상인 소핵과 기타 유사구조물(artifacts)과의 구별이 용이하다는 장점을 갖고 있다. DNA가 주 성분인 소핵은 acridine orange와 결합하면 520 nm 파장의 황록색의 형광을 발하고, RNA 성분은 590 nm의 적색 형광을 발하게 된다. Giemsa 염색시에는 소핵과 유사하게 염색이 되는 지방 과립이나 mucopolysaccharides 성분 또한 적색의 형광을 발하게 됨으로써 황록색의 소핵과는 식별이 분명하다는 장점을 갖는다.

말초혈액을 이용한 초생체 염색법의 또 다른 장점으로는 세포군이 일정하고 규칙적이어서 관찰이 쉽고 빠르다는 것들을 들 수 있으며, 동물실험의 경우, 실험동물을 도살하지 않고 혈액을 반복적으로 채혈할 수 있기 때문에 예비실험 단계가 별도로 필요치 않으며, 다른 독성학이나 약리학적인 실험과 동시에 진행할 수 있다는 장점도 있다. 또한 소핵시험법을 인체에 적용하는 경우, 대규모 인구집단에 대한 스크리닝 검사와 신속한 검사 결과가 요구되는 사고와 관련된 검사에서 사용될 수 있다는 점에 대하여는 많은 전문가들이 공통적으로 동의하고 있다(Surralles와 Natarajan, 1997).

이와 같이 기존의 소핵시험법에 비해 여러 가지 장점을 가진 초생체 염색법을 이용하여 인간의 망상적혈구에 적용한 연구는 발견할 수 없었다. 그러나 말초혈액내 망상적혈구의 빈도가 높은 신생아의 제대혈을 이용하면 이 방법을 적용할 수 있으며, 정상아로 출생한 신생아에서의 소핵 출현 정도를 정량화하고, 소핵 출현 빈도에 영향을 미치는 요소들을 평가하여, 초생체 염색법의 적용 가능성을 조사하고자 하였다.

이 연구에서 제대혈내 망상적혈구 분율의 평균치는 각각 3.88%와 3.51%로 정상 성인에서의 망상적혈구 백분율인 0.5-1.5%(Wyngaarden and Smith, 1985)에 비해 높은 수치를 나타냄으로써 신생아 제대혈이 초생체 염색법을 사용하는 데 적합한 연구대상임이 확인되었다. 이 연구에서 나타난 신생아 제대혈내 소핵의 출현 정도는 2개 지역 모두에서 2,000개의 망상적혈구 중 평균 0-5개로 동물실험에서의 소핵 유발물질 투여 전의 정상치와 유사한 결과를 나타냈다(CSGMT, 1992).

도시 대기 중에는 3,000종 이상의 서로 다른 화학물질이 포함되어 있는 것으로 확인되고 있으며, 이 중에는 유전독성

을 갖는 물질들도 포함되어 있다. 광범위한 도시지역의 대기 오염은 가스와 입자상 물질로 구성된 자동차 배출물질이 주된 원인이 된다(IARC, 1989). 이중 입자상 물질들이 대부분의 발암성 물질을 포함하게 된다. 자동차에서 발생된 오염 물질에 의한 폐암의 증가가 많은 역학적 연구를 통해 보고되고 있으나(Pershagen과 Norberg, 1993), 세포유전학적 접근은 거의 이루어지지 않고 있다.

이 연구에서 신생아 제대혈내 소핵 출현 정도는 오염이 높은 지역에서 평균치가 높았지만, 통계적으로 유의하지는 않았다. 이는 대상 지역간에 SO₂, NO₂, CO, TSP 등의 항목에서 통계적으로 유의한 차이를 가지고 있었지만, 이러한 농도의 차이가 충분한 세포유전학적인 차이를 가져올 만큼의 수준이 아니었는지, 계속적인 연구가 필요하다. 왜냐하면 이 연구에서의 대기환경오염 정도가 각 산모에 대한 개인적인 노출 수준이 아닌 전체 대기오염 수준이었고, 대상자 수가 비교적 적었기 때문이다. 또한 DNA adduct, protein adducts, 비정상적인 정자형성 등 다른 독성학적 검사를 포함한 연구가 필요하다(Au, 1991).

인체의 세포유전독성지표들은 개인간, 그리고 개인 안 변이가 있음을 보고되고 있으며, 이런 변이들은 기술적인 변이, 피검자의 특성, 생활습관 및 여러 직업적, 환경적인 노출과 같은 외부 인자들이 관여되고 있다(Bolognesi 등, 1997). 개인적인 특성과 관련하여 성(sex)도 자매염색분체교환 검사에서 나타나는 정도에 비해 소핵의 출현 빈도에 더 많은 영향을 미치는 것으로 나타나 남자보다 여자에서 더 많은 수의 소핵을 발견할 수 있다고 하였다(Bolognesi 등, 1995). 연령에 의한 영향은 염색체 구조이상이나 자매염색분체교환 검사에서의 결과에 비해 소핵의 출현 빈도가 더 많은 영향을 받아, 연령의 증가와 연관되어 증가한다는 것을 발견하였다(Bolognesi 등, 1997).

이 연구에서는 어머니의 연령과 신생아 제대혈에서의 소핵 출현 빈도가 통계적으로 유의한 상관관계를 나타냈으며(Table 5), 다변량 회귀분석 결과에서도 어머니의 연령에 의한 회귀모델 설명력이 통계적으로 유의한 결과를 보여주었다(Table 6). 소핵 출현 빈도에 대한 연령의 영향에 대해서는 이미 많은 연구들이 진행되어 왔다(나중호 등, 1999; Fenech와 Morley, 1985b; Hogstedt와 Karlsson, 1985; Sarto 등, 1987; Ganguly, 1993; Radack 등, 1995; Thierens 등, 1996; Odagiri 등, 1997; Peace와 Succop, 1999). Surralles와 Natarajan (1997)이 보고한 바에 의하면 유럽 전문가들의 75%는 연령이 증가함에 따라 소핵의 출현 수도 증가한다고 하였다.

그러나 이 연구처럼 산모의 연령에 따라 신생아 제대혈의 소핵 출현빈도가 증가되었다는 연구보고는 찾을 수 없었다. 신생아 제대혈의 소핵 출현빈도가 증가된 것은 산모 혈액의

영향으로 증가되었을 가능성이 있어 향후 계속적인 연구가 필요하다. 많은 연구들이 포유동물의 유전자내의 자연발생적인 체세포 돌연변이 빈도가 연령이 증가함에 따라 함께 증가한다는 것을 보여주고 있다. 이러한 돌연변이 빈도의 증가는 체세포 돌연변이가 노화현상에 앞선 필수적인 과정이라는 가설에 일정하게 나타나고 있다(Morley, 1995, Fenech와 Morley, 1985b). 최근 Zhang 등(1995)은 실제적으로 이러한 자료들 중 성인 동물에서 관찰된 유의한 유전변이 부분은 태내에서 발생한 것이라고 주장하고 있다. Dass 등(1997)은 마우스를 대상으로 한 실험을 통하여 마우스의 주령이 증가할수록 축적된 DNA 손상에 대한 부하의 증가로 인해 자연발생적인 돌연변이의 빈도가 더 커진다는 가설을 통해 연령 증가에 따른 소핵 빈도의 증가를 설명하였다.

생활습관 중에 소핵출현빈도에 가장 영향을 주는 요인은 흡연이다. 흡연이 소핵의 출현 정도 영향을 준다는 보고(문재동 등, 1998; 윤형렬 등, 1993; Hogstedt와 Karlsson, 1985; Stich와 Rosin, 1983)도 있고, 그렇지 않다는 보고(Reali 등, 1987)도 있다.

신생아의 아버지가 흡연을 한 경우는 전체 응답자 51명중 40명으로 78.4%에 달하고 있었으며, 흡연자중 임신기간중에도 실내에서 흡연을 한 경우가 37명이었다. 산모가 임신중 흡연을 한 경우는 전체 대상자 56명중 단 3명뿐이었으므로 분석에서 제외시켰다. 흡연량과 소핵 출현 빈도간의 상관분석에서는 통계적으로 유의하지 않았지만, 다변량 분석에서는 실내흡연에 의한 영향이 통계적으로 유의한 결과를 나타냈다(Table 6). 유전독성 물질에 대한 직업적 노출의 경우, 항암제를 다루고 있는 간호사들에 대한 연구에서, 말초혈내 임파구에서의 소핵 출현 빈도가 노출 기간이 증가할수록 유의하게 증가한다고 보고하였는데(Kasuba 등, 1999), 이 연구에서는 이런 상관성은 보이지 않았다.

세포유전학적 검사의 결과는 피검자의 연령, 성별, 흡연, 음주와 같은 요인과 검체의 종류, DNA 복원률 및 실험방법에 영향을 받아 개인간, 그리고 실험실간 오차가 심한 것으로 알려져 있다(WHO, 1993). 또한 피검자의 특성 이외에도 생활습관과 여러 직업적, 환경적인 노출과 같은 외부인자들이 영향을 주는 것으로 보고되고 있다(Bolognesi, 1997). 하지만 유해물질로 인한 초기 변화를 보다 빨리 평가할 수 있다는 점에서 환경의학 분야에 적극적으로 도입되어야 할 필요성이 있는 실험방법이라고 판단하였다.

신생아 제대혈을 이용한 본 연구의 제한점으로는 첫째, 실험대상 표본이 크지 않았다. 인구집단을 대상으로 한 소핵시험 실시를 위해서는 각 군별 평균 20-25명의 크기가 적당하지만(Surralles와 Natarajan, 1997), 인체를 대상으로 보다 신뢰할만한 유전독성학적인 결과를 제시하기 위해서는 그 이

상의 표본 수가 필요할 것이다. 둘째, 대기질 자동측정망을 통해 얻을 수 있는 환경오염 지표 항목의 한계로 인해 세포 유전학적인 영향을 미칠 수 있는 유해 물질의 농도를 연구에 반영하지 못했다는 것이다. 즉, 공기중 다핵방향족탄화수소, 벤젠, 전리방사선 등의 농도에 대한 평가가 이뤄지지 못하였다. 셋째, 공기중 농도가 전체 지역의 노출 수준이지, 산모 개개인의 노출 수준을 반영하지 못하였다. 넷째로 흡연 등의 중요한 요인에 대한 평가를 설문지에만 의존하였고, 요충 코티닌 등의 조사를 하지 못한 점이다.

이러한 제한점에도 불구하고, 이 연구는 신생아 제대혈을 이용한 초생체 염색법에 의한 소핵시험법의 인체 적용이 가능하다는 것을 확인할 수 있었으며, 또한 산모의 연령 증가, 실내 흡연 등에 의해 소핵의 출현 빈도가 영향을 받는 것으로 나타나, 향후 연구의 기틀을 마련하는데 의미가 있었다.

참고문헌

- 나중호, 김영환, 최재욱, 김해준 (1999): 크롬 노출 근로자의 말초혈액 임파구내 소핵 출현에 관한 연구. *대한산업의학회지*, **11**(3), 393-406.
- 류재천, 최윤정, 김연정, 김형태, 방형애, 송윤선 (1999): 환경오염물질의 진보된 독성 평가 기법. *환경독성학회지*, **14**(1-2), 1-12.
- 문재동, 서순팔, 박정선, 조진형, 안기원 (1998): 석유화학공업 종사자의 유전독성 위험성 평가. *대한산업의학회지*, **10**(1), 53-60.
- 윤형렬, 김장락, 홍대용 (1998): 일부 크롬 근로자들에 있어서 변이원성 자료로서의 소핵검사. *대한산업의학회지*, **10**(1), 53-60.
- Au W.W. (1991): Monitoring human populations for effects of radiation and chemical exposures using cytogenetic techniques. *Occup Med*, **6**(4), 597-611.
- Belien J.A.M., Copper M.P., Braakhuis B.J.M., Snow G.B., Baak J.P.A. (1995): Standardization of counting micronuclei: definition of a protocol to measure genotoxic damage in human exfoliated cells. *Carcinogenesis*, **16**(10), 2395-2400.
- Bolognesi C., Abbondandolo A., Barale R., Casalone R., Dalpra L., Ferrari M., Degrassi F., Forni A., Lamberti L., Lando C., Migliore L., Padovani P., Pasquini R., Puntoni R., Sbrana I., Stella M., Bonassi S (1997): Age-related increase of baseline frequencies of sister chromatid exchanges, chromosome aberrations, and micronuclei in human lymphocytes. *Cancer Epidemiol Biomarkers*, **6**, 249-256.
- Bolognesi S., Bolognesi C., Abbondandolo A., Barale R., Bigatti P., Camurri L., Dalpra L., De Ferrari M., Forni A., Lando C., Padovani P., Pasquini R., Stella M., and Puntoni R (1995): Influence of sex on cytogenetic end points: Evidences from a large human sample and review of the literature. *Cancer Epidemiol Biomarkers*, **4**, 671-679.
- CSGMT (1992): Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: The summary report of the 5th collaborative study by CSGMT/JEMS-MMS. *Mutat Res*, **278**(2-3), 83-98.
- Dass S.B., Ali S.F., Heflich R.H., Casciano D.A. (1997): Frequency of spontaneous and induced micronuclei in the periph-

- eral blood of aging mice. *Mutat Res*, **381**, 105-110.
- Ferech M., Morley A.A. (1985a): Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res*, **147**, 29-36.
- Ferech M., Morley A.A. (1985b): The effect of donor age on spontaneous and induced micronuclei. *Mutat Res*, **148**, 99-105.
- Ganguly B. (1993): Cell division, chromosomal damage and micronucleus formation in peripheral lymphocytes of healthy donors : Related to donor's age. *Mutat Res*, **295**(3): 135-148.
- Gochfeld M. (1995): Principles of toxicology in *Environmental Medicine* (Brook S., Gochfeld M., Jerzstein J., Schenker M., Jackson R. eds). Mosby, St. Louis, pp70.
- Hayashi M., Morita T., Kodama Y., Sofuni T., Ishidate Jr. M. (1990): The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slide. *Mutation Res*, **245**, 245-249.
- Hořman G.R. (1992): Genetic Toxicology in *Casarett and Doull's Toxicology* (Amdur M.O., Doull J., and Klaassen C.D. eds, 4th edition), Macgraw-Hill International Edition, pp201.
- Hogstedt B., Karlsson A. (1985): The size of micronuclei in human lymphocytes varies according to inducing agents used. *Mutat Res*, **156**, 229-232.
- Hulka B.S., Wilcosky T.C., Griffith J.D. (1990): Biological markers in epidemiology. Oxford University Press, New York, pp 125-146.
- IARC (1989): IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Polynuclear aromatic compounds. Part I Vol 32. Lyon, France.
- Kasuba V., Rozgaj R., Garaj-Vrhovac V. (1999): Analysis of sister chromatid exchange and micronuclei in peripheral blood lymphocytes of nurses handling cytostatic drugs. *J Appl Toxicol*, **19**(6), 401-404.
- Morley A.A. (1995): The somatic mutation theory of aging. *Mutat Res*, **338**, 19-23.
- Møller P., Knudsen L.E., Loft S., Wallin H. (2000): The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **9**(10), 1005-1015.
- Odagiri Y., Uchida H., Shibasaki S. (1997): International variation in cytogenetic response to X-ray and colchicine measured with the cytokinesis-blocked micronucleus assay. *Mutat Res*, **381**(1), 1-13.
- Peace B.E., Succop P. (1999): Spontaneous micronucleus frequency and age : What are normal values? *Mutat Res*, **425**(2), 225-30.
- Pershagen G., Norberg S. (1993): Health risk evaluation of nitrogen oxides, *Epidemiological Studies*. *Scand J Work Environ Health*, **19**(2), 57-69.
- Radack K., Pinney S., Livingston G. (1995): Sources of variability in the human lymphocyte micronucleus assay : A population-based study. *Environ Mol Mutagen*, **26**(1), 26-36.
- Reali D., Marino F.D., Bahramandpour S., Carducci A., Barale R., Loprieno N. (1987): Micronuclei in exfoliated urothelial cells and urine mutagenicity in smokers. *Mutat Res*, **192**, 145-149.
- Sarto F., Finotto S., Giacomelli L., Mazzotti D., Tomanin R., Levis A.G. (1987): The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. *Mutat Res*, **223**, 11-17.
- Schmid W. (1975): The micronucleus test. *Mutat. Res.*, **31**, 9-15.
- Stich H.F., Rosin M.P. (1983): Quantitating the synergistic effects of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human buccal mucosa cells. *International J Cancer*, **31**, 305-308.
- Surrallés J., Natarajan A.T. (1997): Human lymphocytes micronucleus assay in Europe. An international survey. *Mutat Res*, **392**, 165-174.
- Thierens H., Vral A., De Ridder L. (1996): A cytogenetic study of radiological workers : Effect of age, smoking and radiation burden on the micronucleus frequency. *Mutat Res*, **360**(2), 75-82.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF (2000): Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*, **35**(3), 206-21.
- WHO (1993): IPCS Environmental Health Criteria 155 : Biomarkers and assessment concepts and principles. Geneva: WHO.
- Wyngaarden J.B., Smith L.H. (1985): Cecil Textbook of Medicine. 17th Edit, W.B.Saunders Company.
- Zhang X.B., Urtande C., Tao K.S., Hoddle J.A. (1995): Factors affecting somatic mutation frequencies *in vivo*. *Mutat Res*, **338**, 189-201.