

## Di-2-EthylHexyl Phthalate, 2-EthylHexanoic Acid 및 Di-2-Ethyl Phthalate의 유전독성 평가

송주영 · 조윤희 · 김양지 · 정해원\*  
서울대학교 보건대학원

### Genotoxicity of Di-2-Ethylhexyl phthalate, 2-EthylHexanoic Acid and Di-2-Ethyl Phthalate in Human Lymphocytes in vitro

Joo Young Song, Yoon Hee Cho, Yang Jee Kim, and Hai Won Chung\*  
School of Public Health, Seoul National University

(Received August 22, 2005 / Accepted September 10, 2005)

**ABSTRACT :** DEHP is one of well known endocrine disruptor and it is used as additives for the production of PVC. There has been contradictional result on the genotoxicity of DEHP. In order to examine genotoxicity of a endocrine disruptors, DEHP (Di-2-EthylHexyl Phthalate) and its two metabolites, EHA (2-EthylHexanoic Acid) and DEP (Di-2-Ethyl Phthalate), chromosome aberration (CA), sister chromatid exchange (SCE), micronuclei (MN) and single cell gel electrophoresis were analysed. No increase of the frequency of CA was observed by DEHP and its two metabolites. DEHP increased the frequency of SCE and MN whereas EHA only increased the frequency of SCE. DEP increased the frequency of SCE but the increase was not statistically significant. DEHP and DEP, also induced DNA damage. It is suggested that combination of different methods were recommended to find the genotoxicity of DEHP and its metabolites.

Key words : DEHP, EHA, DEP, genotoxicity, chromosome aberration, sister chromatid exchange, micronuclei, single cell gel electrophoresis

#### 서 론

플라스틱 물질을 만들 때 신축성, 접착성, 유연성, 안전성을 좋게 하기 위해 다량의 가소제를 넣는데, 주로 가소제로 사용되고 있는 phthalate계 ester 화합물은 약 10여종으로 di-2-ethylhexylphthalate (DEHP), di-n-butyl phthalate (DBP), butylbenzyl phthalate (BBP), di-ethyl phthalate (DEP) 등과 adipate 계통인 di-2-ethylhexyl adipate (DEHA)등이 있다. 이러한 물질들은 내분비계 장애물질 (환경호르몬)의 하나로 분류되고 있으며 이 중에서 DEHP는 국내에서 가장 많이 사용되는 PVC 가소제로 그 사용량이 계속 증가하고 있다. DEHP는 화장품, 향수 등의 일상생활에서 매일 사용하는 생활 필수품에 포함되어 있어서 얼굴, 머리 손 등 인체에 직접 투여 되어 활동 시간에 항상 인체에 붙어 있다는 점과 여러 제품을 동시에 사용한다는 특징 때문에 그 위해성이 더욱 우려되고 있다. 게다가 PVC 소재 제품인 바닥재 벽지,

카펫, 타일 등과 의료제품인 혈액백, 수액백 등의 사용으로 혈액 투석 환자나 장기 입원 환자의 경우는 체내로 노출이 가능하기 때문에 그 위해성이 더욱 증가되고 있다. 특히, 혈액백의 경우는 저장된 혈액 속에 혈액백의 DEHP 물질이 녹아 나와 혈액과 plasma 내에서 발견되었다는 보고가 있었으며 (Rubin *et al.*, 1976; Miripol *et al.*, 1977; Albor and Corbett, 1978; Rock and Secours, 1978; Vessman *et al.*, 1978; Peck and Odom, 1979; ATSDR, 2000) DEHP가 수혈 받는 사람의 몸에서 발견되었다는 연구 (Jaeger and Rubin, 1972)와 함께 phthalate 관련 물질을 생산하는 직업에 종사하는 사람들의 urine을 분석한 결과 DEHP는 인체 내에서 biotransfusion 하여 여러 개의 metabolites가 생성된다는 연구도 보고되었다 (Hoppin *et al.*, 2002). 유럽 공동체에서는 1999년에 아동 장난감을 비롯한 몇 개의 제품에 이러한 화학물질을 사용하는 것을 금지하였고 단일제품, 단일 종류의 phthalate 노출을 규제하는 유럽규제 수위에 대해 문제제기를 하고 있는 상황이다. 반면 우리나라는 phthalate에 대한 연구도 많이 이루어져있지 않고 화장품의 phthalate에 대한 기준도 없을 뿐만 아니라 구성물질을 표시

\*To whom correspondence should be addressed

하지 않고 있어 사용하는 사람들은 무방비 상태에서 phthalate에 노출되고 있다.

내분비계 장애물질의 특성은 구조적으로 안정하여 쉽게 분해되지 않고 환경 혹은 생체 내에 들어와서 수년간 잔존하기도 한다. 내분비계 장애물질에 의해서 처음으로 동물에서 이상 증상이 발견된 이후 연구는 동물을 대상으로 하는 실험이 주를 이루어왔으며 사람을 대상으로 한 연구는 제한적으로 이루어져 왔기 때문에 아직도 phthalate를 포함한 내분비 장애물질의 인체에 미치는 영향을 판단하는 자료가 절대적으로 부족하다. 환경호르몬이 대한 그 동안의 연구는 주로 표적 기관인 생식계에 미치는 영향에 대한 연구가 주를 이루고 있으며 세포나 염색체, DNA level에서 이루어진 연구는 상대적으로 적고 그 독성 여부도 확실치 않다.

DEHP의 유전독성에 대해서는 연구자에 따라 상이한 결과가 보고되고 있다. 즉, CHO cell에서 자매염색분체나 DNA 손상이 유도되지 않았으며 생쥐혈액에서도 소핵은 유발되지 않았다는 보고가 있는 반면, 사람의 말초혈액과 rat의 간세포에 처리했을 때 자매염색분체가 증가했다는 보고(Lindahl-Kiessling, *et al.*, 1989) 및 사람 림프구에서 DNA 손상이 증가했다는 결과도 보고되고 있었다(Anderson *et al.*, 1999). DEHP는 체내에 들어가 빠르게 분해되는 특징이 있기 때문에(Hoppin *et al.*, 2002) 그 자체의 독성 연구 뿐만 아니라 그것의 metabolites의 독성 연구도 이루어졌다. Anderson *et al.* (1999)의 연구에 의하면 parent chemical 인 DEHP보다 그것의 대사산물인 MEHP가 더 독성이 강한 것으로 보고하고 있다.

EHA는 *Sallmonella*를 이용한 돌연변이 분석에서 음성으로 나타났지만(British Industrial Biological Research Association Toxicology International, 1990) 사람의 림프구에서는 자매염색분체 교환을 유도했다는 연구도 보고되고 있다(Sipi *et al.*, 1992).

DEP는 사람을 대상으로 이루어진 연구와 급성, 만성 동물 실험을 통해서 약한 독성이 있는 것으로 나타났다(Kamrin and Mayor, 1991). *Sallmonella*를 이용한 돌연변이 분석에서는 특정 균주에서 gene mutation이 유도되었고 CHO세포에서는 염색체 이상은 나타나지 않았으나 자매염색분체는 유도되었다는 보고가 있었다(NTP, 1995; Api, 2001).

즉 현재까지 연구를 보면 사용한 독성기법에 따라 결과가 상이하게 나타나는 것을 알수있다. 따라서 인체에 나타나는 환경호르몬의 영향을 파악하기 위해서 정확하게 판단할 수 biomarker의 개발 및 선택이 중요하다. 따라서 본 연구에서는 DEHP와 그 metabolites인 EHA, DEP의 독성을 염색체 이상분석, 자매염색분체교환분석, 소핵분석 및 단일세포

젤 전기영동법 등의 다양한 기법을 사용하여 평가하고자 하였다.

## 연구 방법

### 세포배양 및 chemical 의 처리

건강한 사람 림프구에 di-2-ethylhexyl phthalate (Sigma)는 0.5, 1.0, 2.0 mM의 농도(Anderson *et al.*, 1999)를 처리하였고 2-ethylhexanoic acid (Aldrich)는 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 mM 농도(Sipi *et al.*, 1992)로, di-2-ethyl phthalate (Aldrich)는 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mM 농도로 G0기에 처리하여 10%의 우태아 혈청(GIBCO)이 포함된 RPMI 1640(GIBCO)에 3시간 동안 배양시켰다. 3시간 후에 인산완충 용액으로 세척하고 새로운 배지와 PHA를 처리하여 다시 배양하였다.

실험에 사용한 chemical은 DMSO(dimethylsulfonate)에 녹여 사용하였으며 대조군에는 동량의 DMSO를 처리하였다.

### 염색체 이상 분석

혈액 1 ml를 10%의 우태아혈청, 항생제가 포함된 RPMI 1640 배지 9 ml에 넣은 후에 chemical을 농도별로 처리하고 CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C incubator에 3시간 동안 배양하였다. 이를 인산완충용액으로 세척한 후에 PHA를 넣어 세포 분열이 촉진된 상태에서 48시간 동안 incubator에서 48시간을 배양하는 일반적인 방법에 의해 염색체 슬라이드를 작성했다(IAEA, 2001). 염색체 이상은 각 농도별로 100개의 세포를 무작위 선택하여 관찰하였다.

### 자매염색분체교환 분석

즉 혈액 1 ml를 10%의 우태아 혈청, 항생제가 포함된 RPMI 1640 배지 9 ml를 넣은 후에 chemical을 농도별로 처리하고 CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C incubator에서 3시간 동안 배양하였다. 이를 인산완충용액으로 세척한 후 PHA와 Bromodeoxyuridine(BrdU)를 동시에 처리하고 72시간 동안 incubator에서 추가 배양한 후 Fluorescent plus Giemsa 방법(Perry and Wolf, 1974)에 의해 슬라이드를 제작하였다. 각 농도별로 60개의 세포를 무작위로 관찰하여 하나의 세포당 일어나는 평균 염색분체교환 빈도로 분석하였다.

### 소핵분석

Fenech의(1993) 방법에 따라 시행하였다. 혈액 1 ml를 10% 우태아 혈청, 항생제가 포함된 RPMI 1640 배지 9 ml에 넣은 후 chemical을 농도별로 처리하고 CO<sub>2</sub>가 공급되는 incubator에서 3시간 동안 배양하였다. 인산완충용액으로 세

**Table 1.** The frequency of chromosome aberration in human lymphocytes induced by DEHP

Treatment (mM)	No. of cells counted	aberrant cells/100 cells	Structural Aberration/100 cells						RI
			Chromatid type			Chromosome type			
			exchange	deletion	total	exchange	deletion	total	
Control	100	2	0	2	2	0	0	0	1.43
DMSO	100	0	0	0	0	0	0	0	1.40
0.5	100	2	0	2	2	0	0	0	1.45
1	100	3	0	3	3	0	0	0	1.32
2	100	2	0	2	2	0	0	0	1.20
Kendall's		0.054							
p		0.231							

\* Kendall's was calculation on cell bases.

\* RI: Replication Index

**Table 2.** The frequency of chromosome aberration in human lymphocytes induced by EHA

Treatment (mM)	No. of cells counted	aberrant cells/100 cells	Structural Aberration/100 cells						RI
			Chromatid type			Chromosome type			
			exchange	deletion	total	exchange	deletion	total	
Control	100	2	0	2	2	0	0	0	1.43
DMSO	100	0	0	0	0	0	0	0	1.40
0.5	100	3	0	3	3	0	0	0	1.40
1	100	4	0	4	4	0	0	0	1.38
1.5	100	4	0	4	4	0	0	0	1.37
2	100	2	0	2	2	0	0	0	1.33
2.5	100	3	0	3	3	0	0	0	1.32
Kendall's		0.032							
p		0.373							

\* Kendall's was calculation on cell bases.

\* RI: Replication Index

**Table 3.** The frequency of chromosome aberration in human lymphocytes induced by DEP

Treatment (mM)	No. of cells counted	aberrant cells/100 cells	Structural Aberration/100 cells						RI
			Chromatid type			Chromosome type			
			exchange	deletion	total	exchange	deletion	total	
Control	100	2	0	2	2	0	0	0	1.43
DMSO	100	0	0	0	0	0	0	0	1.40
0.5	100	3	0	3	3	0	0	0	1.40
1	100	0	0	0	0	0	0	0	1.33
1.5	100	2	0	2	2	0	0	0	1.30
2	100	3	0	3	3	0	0	0	1.32
Kendall's		0.05							
p		0.208							

\* Kendall's was calculation on cell bases

\* RI: Replication Index.

척한 후에 PHA를 처리하여 배양한 후 44시간 뒤에 Cytochalasin B (3 µg/ml)를 처리하고 28시간 추가 배양하였다. 소핵슬라이드를 제작하고 giemsa 염색하여 분석하였다. 분석시 핵이 두개인 경우만 포함시키고 또한 핵막이 뚜렷하며 본핵의 1/3 이하의 크기인 경우만을 분석대상으로 하였으며 각 농도당 1000개의 세포를 관찰하였다.

#### 단세포전기 영동법

Singh (1988)의 방법에 준하여 수행하였다. 즉 혈액을 배지에 넣고 chemicals을 농도별로 6시간 처리한 후 4°C로 유지하였다. 이산완충용액으로 남아있는 화학물질을 세척한 다음 Ficoll을 이용한 밀도구배 방법에 의해 림프구를 추출하였다. 이후, Fully frosted slide glass에서 0.6% normal melting agarose gel에 림프구를 섞은 후 슬라이드를 차가운 lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 10 mM Tris base, 1% N-Lauryl sarcosinate, 1% Triton X-100, pH 10) 담가 4°C에서 1시간 세포를 용해시켰다. 3차 증류수로 슬라이드에 남아 있는 염을 제거한 후에 슬라이드를 electrophoretic buffer (300 mM NaOH, 0.1% 8-hydroxyquinoline, 2% DMSO, 10mM Na<sub>4</sub>EDTA, pH > 12.3)에 장치하고 20분간 방치한 후에 22 V, 330 mA로 전기영동을 시행하였다. 전기영동 후 슬라이드를 0.4 M Tris로 5분간 3회 중화시켰고 DNA가 슬라이드에 고정되도록 1시간 동안 100% 에탄올에 담가 두었다. 슬라이드를 건조시킨 후 Ethidium bromide (20 µg/ml) 60 µl로 형광 염색하고 G2A filter (515-560의 excitation, 590nm의 barrier filter)를 이용하여 400배율로 관찰하였다. 한 농도에서 60개의 세포를 무작위로 선택하였으며 이미지 분석 프로그램 (Image-Pro Plus 4.0)을 통해 DNA 손상 정도를 head 중심에서 tail로의 DNA 단편의 이동거리로 분석하였다.

#### 통계분석

DEHP, EHA, DEP의 농도에 따른 염색체 이상 및 자매 염색분체 교환빈도와의 관계를 살펴보기 위해서 Kendall's rank test를 실시하였으며 소핵 분석 빈도와의 관계를 살펴보기 위해서 Kendall's rank test와 Wilcoxon test를 실시하였다. 또한 DEHP, EHA, DEP의 처리 농도 따라 DNA 손상 정도가 차이가 있는 지를 보기 위해서 ANOVA로 통계분석 하였다.

## 연구결과

본 연구에서는 염색체의 구조적 이상과 수적 이상, double strands breakage (DSB)와 genotoxicity, cytotoxicity를 알아

**Table 4.** The frequency of sister chromatid exchange induced by DEHP

Dose (mM)	No. of cells scored	SCE/Cell (mean ± S.E.)	Range
Control	60	3.52 ± 0.30	0-10
DMSO	60	3.57 ± 0.28	0-10
0.5	60	3.32 ± 0.33	1-18
1.0	60	3.95 ± 0.23	1-9
2.0	34	4.42 ± 0.44	0-11
Kendall's		0.129	
p		0.049	

\* Kendall's was calculation on cell bases.

\* S.E. : standard error

**Table 5.** The frequency of sister chromatid exchange induced by EHA

Dose(mM)	No. of cells scored	SCE/Cell (mean ± S.E.)	Range
Control	60	3.52 ± 0.30	0-10
DMSO	60	3.57 ± 0.28	0-10
0.5	60	3.68 ± 0.30	0-9
1	60	3.38 ± 0.22	0-8
1.5	60	3.98 ± 0.26	0-11
2	60	3.95 ± 0.22	1-8
2.5	60	5.03 ± 0.30	1-14
Kendall's		0.155	
p		0.0001	

\* Kendall's was calculation on cell bases.

\* S.E. : standard error

**Table 6.** The frequency of sister chromatid exchange induced by DEP

Dose (mM)	No. of cells scored	SCE/Cell (mean ± S.E.)	Range
Control	60	3.52 ± 0.30	0-10
DMSO	60	3.57 ± 0.28	0-10
0.5	60	3.30 ± 0.22	1-8
1	60	3.75 ± 0.26	0-10
1.5	60	3.62 ± 0.24	0-8
2	60	4.40 ± 0.27	1-9
Kendall's		0.034	
p		0.593	

\* Kendall's was calculation on cell bases.

\* S.E. : standard error

볼 수 있는 염색체 이상 분석, single strand breakage (SSB)와 genotoxicity를 알아볼 수 있는 자매염색분체 교환

분석, DSB, cytogenotoxicity, genotoxicity를 알아보는 소핵 분석 그리고 DNA damage (SSB, alkali labile sites, crosslinking)를 알아볼 수 있는 단일 세포 젤 전기 영동법을 수행하였다.

사람 림프구에서 세포독성을 유발하는 것으로 나타났던 농도를 기준으로 DEHP는 0.5, 1.0, 2.0 mM의 농도를, EHA는 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mM의 농도를, DEP는 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mM 농도를 처리하였다. Table 1,2,3에서 보는 바와 같이 DEHP, EHA 및 DEP 모두 염색체 이상 분석에서 음성으로 나타났다.

또한 DEHP 및 EHA는 농도가 증가함에 따라 자매염색 분체 교환의 빈도가 증가하는 경향을 보고주고있으며 DEP는 2 mM의 농도에 의한 빈도가 증가하는 것을 알수있다 (Table 4,5,6).

DEHP 농도가 증가함에 따라 소핵 빈도는 증가되었으나 EHA나 DEP는 양반응관계를 보여주지 않았지만 높은 농도에서는 대조군에 비해 증가하는 양상을 보고주고있다 (Table 7,8,9)

DEHP 및 DEP는 농도에 따라 DNA 손상이 증가하는 양반응 관계를 보여주었으며 (Fig. 1, 2) EHA는 (Fig. 3) 1.5 mM의 농도에서만 대조군에 비해 DNA 손상이 증가하는 양상을 보여주고있다.

즉, Table 10에서 보는 바와 같이 Parent chemical인 DEHP의 경우는 염색체 이상을 제외한 나머지 분석에서 유전독성이 있는 것으로 나타났으며 EHA는 자매염색분체 교환 분석과 단일세포 젤 전기 영동법에서 그리고 DEP는 단일 세포 젤 전기영동법에서 유전독성이 있는 것으로 나타났다.

## 고 찰

내분비 교란 물질 (Endocrine disruptors)란 생체 내 항상성 유지와 성장발육을 조절하는 호르몬의 생산, 분비, 운반, 대사, 수용체와의 결합, 작용기전 등을 교란시키는 유해화학 물질을 일컫는 용어 (Bigsby, 1999)이다. 이러한 내분비 교란 물질이 인체에 미치는 영향은 특정 몇몇 물질을 제외 하

**Table 7.** The frequency of micronucleus in human lymphocytes induced by DEHP

Dose(mM)	No. of BN cells	No. of BN cell with MN					CBPI
		total MN	MN = 1	MN = 2	MN = 3	MN = 4	
Control	1,000	8	6	1	0	0	2.28
DMSO	1,000	9	7	1	0	0	2.29
0.5	1,000	8	6	1	0	0	2.34
1.0	1,000	20	13	2	1	0	2.21
2.0	1,000	23	13	3	0	1	2.09
Kendall's		0.045					
p		0.001					

\* Kendall's was calculation on cell bases \* BN: binucleated cell \* CBPI: Cytokinetic Blocked Proliferation Index

**Table 8.** The frequency of micronucleus in human lymphocytes induced by EAH

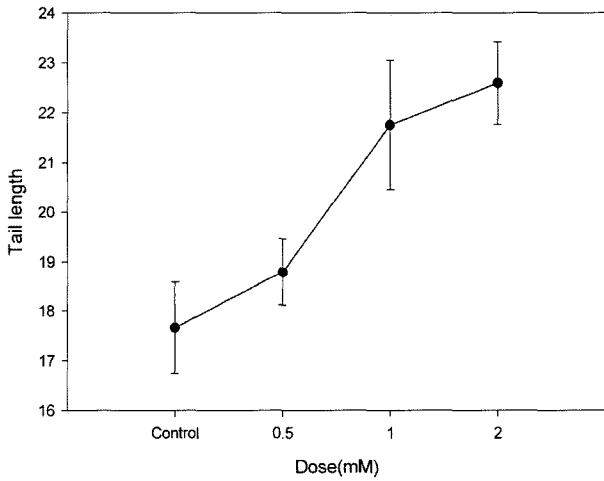
Dose(mM)	No. of BN cells	No. of BN cell with MN					RI
		total MN	MN = 1	MN = 2	MN = 3	MN = 4	
Control	1,000	8	6	1	0	0	2.28
DMSO	1,000	9	7	1	0	0	2.29
0.5	1,000	9	7	1	0	0	2.29
1.0	1,000	18	13	1	1	0	2.27
1.5	1,000	11	11	0	0	0	2.26
2.0	1,000	18	14	2	0	0	2.22
2.5	1,000	13	13	0	0	0	2.21
Kendall's		0.015					
p		0.183					

\* Kendall's was calculation on cell bases \* BN: binucleated cell \* CBPI: Cytokinetic Blocked Proliferation Index

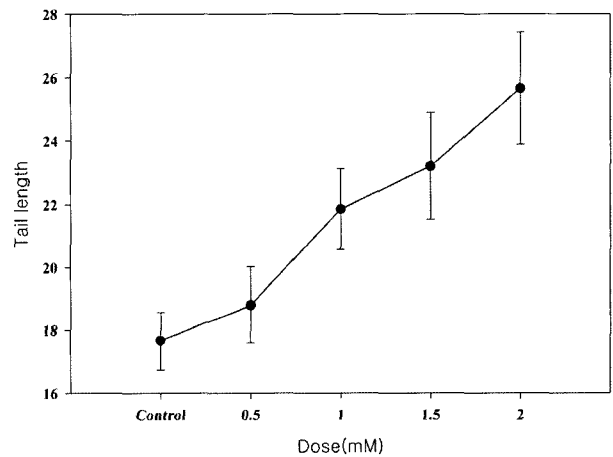
**Table 9.** The frequency of micronucleus in human lymphocytes induced by DEP

Dose(mM)	No. of BN cells	No. of BN cell with MN					RI
		total MN	MN = 1	MN = 2	MN = 3	MN = 4	
Control	1,000	8	6	1	0	0	2.28
DMSO	1,000	9	7	1	0	0	2.29
0.5	1,000	15	15	0	0	0	2.29
1.0	1,000	18	16	1	1	0	2.22
1.5	1,000	14	12	1	0	0	2.19
2.0	1,000	18	16	1	0	0	2.21
Kendall's		0.018					
p		0.160					

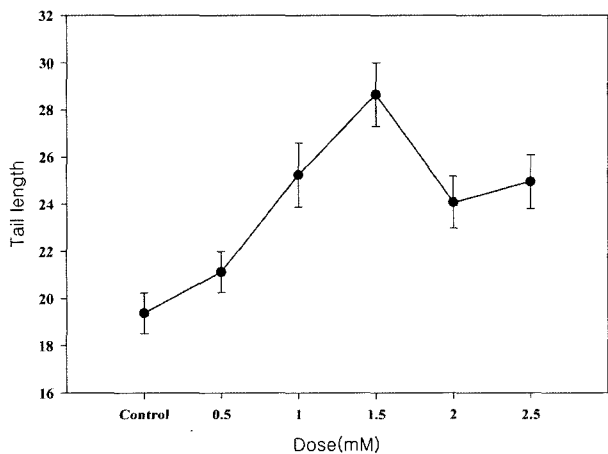
\* Kendall's was calculation on cell bases \* BN: binucleated cell \* CBPI: Cytokinetic Blocked Proliferation Index



**Fig. 1.** DNA damage in human lymphocytes induced by DEHP.



**Fig. 3.** DNA damage in human lymphocytes induced by DEP.



**Fig. 2.** DNA damage in human lymphocytes induced by EHA.

**Table 10.** Genotoxicity of DEHP and its metabolites, EHA and DEP determined by different test methods

	DEHP	EHA	DEP
Chromosome Aberration (CA)	-	-	-
Sister Chromatid Exchange (SCE)	+	+	±
MicroNuclei (MN)	+	±	±
Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE)	+	±	+

고는 다양한 물질에 대한 연구가 아직 부족하고 생체 내에서 이루어지는 작용 기전이 복잡해서 그 영향을 파악하기 어렵다. 그리고 여러 가지 야생생물에서 보고가 되어있는 갑상선의 기능저하, 임신능력의 저하, 생식행동 이상, 생식기의 기형, 탈 수컷 및 암컷 화, 면역기능의 저하 등의 증상이 사람에게도 동일하게 나타날 가능성과 환경호르몬에 대한 감수성이 종마다 차이가 날 가능성에 대해서는 아직 명확하게 보고된 바가 없다. 또한 지금까지 연구된 내분비교란 작용을 나타낸 물질들은 그 작용 범위와 손상 정도가 달랐기 때문

에 다양한 내분비 교란 물질의 인체 내에서의 작용 범위와 손상 정도를 파악할 수 있는 자료를 위한 연구가 다방면에서 신속하게 이루어져야 할 것이며 행해지는 다양한 기초 자료를 기본으로 물질 간의 비교 연구를 통하여 Environment risk assessment를 해 나아갈 필요가 있다.

본 연구에서는 이러한 내분비 교란 물질로 분류되고 있는 물질 중에서 우리가 일상생활에서 가장 많이 접하여 인체로의 노출이 쉬운 DEHP와 그것의 대사산물인 EHA, DEP의 물질을 다양한 분자독성평가 방법을 이용해서 독성 여부를 평가하였다.

본 연구 결과 parent chemical인 DEHP는 염색체 이상 분석을 제외한 자매염색분체교환 분석, 소핵 분석, 단일 세포 젤 전기영동 분석에서 농도에 따라 증가되는 양반응 관계를 보여주었다. 또한 DEHP의 대사산물 중 하나인 EHA는 자매염색분체 교환분석과 단일 세포전기영동 분석에서 양성으로 나타났으며, 소핵 및 자매염색분체교환 분석에서는 그 결과가 불분명하였다. 또다른 대사산물인 DEP는 단일 세포 전기영동 분석에만 양성으로 나타났으며 나머지 분석에서는 명확한 결과를 보여주지 않았다. Kavlock 등 (2002)은 DEHP는 사람의 림프구에서 염색체 이상을 유발하지 않는다고 보고하여 본 연구결과와 일치되는 것으로 나타났지만, Kluwe 등 (1986)은 생쥐를 이용한 소핵분석 결과 음성의 결과를 보고하여 본 연구와 상반된 연구결과를 보여주었다. 그러나 사람의 림프구를 대상으로 소핵분석을 보고한 연구 결과는 찾아볼 수 없어 단정적으로 결론내리기는 어렵다.

소핵은 염색체의 절단에 의해서도 형성되지만 염색체의 불 분리 현상에 의해서도 형성될 수 있기 때문에 구조적 염색체 이상은 유발하지 않지만, 수적 염색체 이상을 유발하는 물질 (aneugen)을 찾아낼 수 있는 분석 방법이 될 수 있다.

Lindahl-Kiessling 등 (1989)은 1 mM의 DEHP를 사람의 림프구에 처리한 결과 자매염색분체 교환 빈도가 증가한다고 보고하여 본 연구결과를 뒷받침 해준다. 자매 염색분체 교환 분석법은 유해 화학물질의 유전 독성을 가장 민감하게 반영해 주는 방법으로 알려져 있으며 염색체 이상 분석에서 양성으로 나타났지만 자매염색분체 교환분석에서는 양성으로 나타나는 경우가 다수 보고되고 있다 (Abe and Sasaki, 1977).

단일 세포 전기 영동법은 Singh (1988)에 의해 발전된 이후 DNA 단일 가닥 및 양가닥 절단을 측정하는 방법으로 사용되기 시작하였으며 특히 단일가닥 절단을 유발하는 물질을 측정하는데 유용하다. Anderson 등 (1999)은 DEHP는 사람의 림프구에서 DNA손상을 일으킨다고 보고하여 본 연구 결과를 뒷받침 하고있다. EHA의 유전독성에 대한 연구 결과는 많지않으나 Ames test 결과 음성으로 나타났다는 보

고 (British industrial Biological Research Association Toxicology international, 1990) 그리고 사람의 림프구에서 자매염색분체 교환을 유발하는것으로 보고되고 있어서 (Sipi et al., 1992) 본 연구결과와 같은 양상을 보여주었다. DEP는 유전독성이 없다고 보고되었지만 (Berg and Mayer, 1991), Api (2001)는 CHO 세포를 대상으로 한 연구에서 DEP는 염색체 이상을 유발하지 않지만 자매염색분체교환을 유발한다고 보고한 바 있다. 본 연구 결과, DEP는 2 mM의 고농도에서만 자매염색분체교환을 유발하였는데 양반응 관계를 보여주지 않았다. 즉, 사용한 유전독성 방법에 따라 그 결과가 달리 나타남을 알수 있었으며 유전 독성을 평가 할 때는 다양한 방법을 적용하고 적절한 분석 방법을 선택하는 것이 필요하다는 것을 알수 있었다

따라서 독성여부를 판단할 때는 하나의 기법을 통해서 만 이 아니라 다양한 분자 독성학적 기법을 이용하여 그 독성 여부를 판단하는 것이 옳다고 보아 진다.

## 참 고 문 헌

- Abe, S. and Sasaki, M. (1977): Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in chinese hamster cells exposed to various chemicals, *J. natl. cancer*, **58**, 1635-1977.
- Albor, P.W. and Corbett, J.T. (1978): Distribution of di- and mono-(2-ethylhexyl) phthalate in human plasma, *Transfusion*, **18**(6), 750-755.
- Anderson, D., Yu, T.W. and Hincal, F. (1999): Effect of some phthalate esters in human cells in the comet assay, *Teratog. Carcinogen. Mutagen.*, **19**, 275-280.
- Api, A.M. (2001): Toxicological profile of diethyl phthalate; a vehicle for fragrance and cosmetic ingredients, *Food and Chemical Toxicology*, **39**, 97-108.
- ATSDR. Agency for toxic substances and disease registry (2000): Toxicological profile for di(2-ethylhexyl) phthalate. Update. (Draft for Public Comment). Atlanta, GA. ; ATSDR, Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services. 278.
- Berg, J.H. and Mayer, G.H. (1991): Diethyl phthalate not dangerous, *AJHP*, **48**, 1448-1449.
- Bigsby, R. (1999): Evaluating the effects of endocrine disruptors on endocrine function during development, *Environ. Health Perspect*, **107** Suppl (4), 613-618.
- British Industrial Biological Research Association Working Group B, (1990): 2-Ethylhexanoic acid : toxicity profile. *British Industrial Biological Research Association Toxicology International*.
- Fenech, M. (1993): The cytokinesis-block micronucleus technique; a detailed description for the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutate. Res.*, **285**, 35-44.
- Hoppin, J.A., Brock, J.W., Davis, B.J. and Baird, D.D. (2002): Reproducibility of urinary phthalate metabolites in first morn-

- ing urine samples, *Environ. Health perspect.*, **110**(5), 515-518.
- International Atomic Energy Agency. Biological dosimetry. (2001): Cytogenetic analysis for radiation dose assessment. IAEA, Vienna, *IAEA Technical Reports Series* 405.
- Jaeger, R.J. and Rubin, R.J. (1972): Migration of a phthalate ester plasticizer from polyvinyl chloride blood bag into stored human blood and its localization in human tissues, *New Engl. J. Med.*, **287**, 1114-1118.
- Kamrin, M.A. and Mayor, G.H. (1991): Diethyl phthalate : a perspective, *J. Clin. Pharmacol.*, **31**, 484-489.
- Kavlock, R. et al. (2002): NTP Center for the evaluation of risks to human reproduction: phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of di (2-ethylhexyl) phthalate, *reproductive toxicology*, **16**, 529-653.
- Kluwe, W.M., Haseman, J.K., Douglas, J.F. and Huff, J.E. (1982): The carcinogenicity of dietary di(2-ethylhexyl) phthalate(DEHP) in fischer 344 rats and B6C3F1 mice, *J. Toxicol. And Environ. Health*, **10**, 797-815.
- Lindahl-Kiessling, K., Karlberg, I. and Olofsson, A.M. (1989): Induction of sister-chromatid exchanges by direct and indirect mutagens in human lymphocytes, co-cultured with intact rat liver cells. Effect of enzyme induction and preservation of the liver cells by freezing in liquid nitrogen, *Mutat. Res.*, **211**, 77-87.
- Miripol, J.E. and Stern, I.J. (1977): Decreased accumulation of phthalate plasticizer during storage of blood as packed cells, *transfusion*, **17**(1), 71-72.
- NTP. (1995): Toxicology and carcinogenesis studies for diethylphthalate in F344/N rats and B6C3F1 Mice(dermal studies) with Dermal Initiation/Promotion Study of Diethylphthalate and Dimethylphthalate in Male Swiss (CD-1) Mice. Technical Report Series No. 429. National Toxicology Program, PO Box 12233, Research Triangle Park, NC 27709, USA.
- Peck, C.C. and Odom, D.G. (1979): Di-2-ethylhexyl phthalate(DEHP) and mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP) accumulation in whole blood and red cell concentrate, *transfusion*, **19**(2), 137-146.
- Perry, P. and Wolf, S. (1974): New giemsa method for the differential staining of sister chromatids, *Nature*, **251**, 156-158.
- Rock, G. and Secours, V.E. (1978): The accumulation of mono-2-ethylhexylphthalate during storage of whole blood and plasma, *transfusion*, **18**(5), 553-558.
- Rubin, R.J. and Schiffer, C.A. (1976): Fate in humans of the plasticizer, di-2-ethylhexyl phthalate, arising from transfusion of platelets stored in vinyl plastic bags, *transfusion*, **16**(4), 330-335.
- Singh, N.P. (1988): A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell. Res.*, **175**, 184-191.
- Sipi, P., Jarventaus, H. and Norppa, H. (1992): Sister chromatid exchanges induced by vinyl esters and respective carboxylic acids in cultured human lymphocytes. *Mutat. res.*, **279**, 75-82.
- Vessman, J., Rietz G, Sana V. (1978): Formation of mono (ethylhexyl)phthalate from di(ethylhexyl)phthalate in human plasma stored in PVC bags and its presence in fractionated plasma proteins, *Vox. Sana.*, **35**, 75-80.