

이소시아네이트 화합물의 변이원성 비교연구

1992



한국산업안전공단
산업보건연구원

제 출 문

한국산업안전공단 이사장 귀하

본 보고서를 “이소시아네이트 화합물의 변이원성 비교연구”의 연구보고서로 제출합니다.

1992. 12

원 장 : 정 규 철
연구책임자 : 목 명 수
공동연구자 : 임 철 홍

목 차

1. 서론

1-1. 환경성 질환의 증가와 화학물질의 규제 필요성-----	1
1-2. 각국 및 국제기관의 화학물질 규제활동: 신규화학물질 유해성심사-	3
1-3. 유전독성-----	30
1-4. 이소시아네이트 화합물-----	40
1-5. 연구동기-----	44

2. 시험방법

2-1. 시험물질 및 시약-----	46
2-2. 최소글루코스한천평판배지의 제작-----	46
2-3. Top agar의 조제-----	48
2-4. S9의 조제-----	49
2-4-1. 동물의 전처리-----	49
2-4-2. S9의 조제-----	49
2-4-3. S9 Mix의 조제-----	50
2-5. 시험균주의 전배양과 냉동보관-----	50
2-6. 시험균주의 특성과 동정시험-----	53
2-6-1. 시험균주의 특성-----	53
2-6-2. Histidine 요구성시험-----	55
2-6-3. 막변이(Crystal violet)시험-----	55
2-6-4. Ampicillin 내성시험-----	57
2-6-5. 양성대조물질과 양성대조시험-----	57
2-7. 시험물질의 조제-----	58

2-8. 시험물질의 세포독성시험으로서의 농도 결정시험-----	58
2-8-1. 정성적 시험-----	58
2-8-2. 정량적 시험-----	59
2-9. 시험물질의 변이원성 시험-----	59
2-10. 변이원성 결과의 평가방법-----	60
 3. 시험결과 및 토론-----	 63
 * 국문요약-----	 80
 * 참고문헌-----	 82

표 목 차

표 1: 일반적인 인간활동으로부터 오는 연간 사망위험율-----	1
표 2: 화학물질 규제와 관련된 유엔의 기구와 활동-----	4
표 3: OECD Minimum Premarketing Set of Data(MPD)-----	6
표 4: OECD GLP 기준 (GOOD LABORATORY PRACTICE PRINCIPLES)-----	7
표 5: OECD Chemical Test Guideline-----	8
표 6: Laws and acts related to exposures to toxic substances and chemical regulation in USA-----	12
표 7: Statistics through fiscal year 1990 Pursuant to TSCA 5(a)----	16
표 8: 미국에서 엄격히 심사되는 화학구조 Categories-----	17
표 9: Summary of Exposure-Based Criteria-----	18
표 10: 개성화심법(일본), TSCA(미국), EC제국의 법 비교-----	26
표 11: 한국에서의 화학물질관리 관계 법령-----	28
표 12: Mutagenicity Testing Batteries by 3 Basic Categories of Genectic Endpoints-----	33
표 13: Minimal mutagenicity testing requirements in countries-----	34
표 14: 시험 균주의 특성-----	56
표 15: Identification of tester strains: Histidine auxotroph test----	64
표 16: Identification of tester strains: Crystal violet test-----	64
표 17: Identification of tester strains: Ampicillin resistance test--	64
표 18: Identification of tester strains: Mutagenic potentials of positive materials(known mutagens)-----	65
표 19: Qualitative cytotoxicity of TDI and MDI using TA98 (background lawn and spontaneous revertants obtained with TA98 following exposure to TDI or MDI and known mutagens in	

pour plate method)-----	67
⌘ 20: Quantitative cytotoxicity of TDI and MDI using TA98 (Spontaneous revertants obtained with TA98 following exposure to TDI or MDI in pour plate method)-----	69
⌘ 21: Quantitative cytotoxicity of TDI and MDI using TA100 (Spontaneous revertants obtained with TA98 following exposure to TDI or MDI in pour plate method)-----	71
⌘ 22: Revertants colony counts and means obtained with TA 98 following exposure to TDI or MDI and known mutagens in pour plate method(1)-----	72
⌘ 23: Revertants colony counts and means obtained with TA 98 following exposure to TDI or MDI and known mutagens in pour plate method(2)-----	73
⌘ 24: Revertants colony counts and means obtained with TA 100 following exposure to TDI or MDI and known mutagens in pour plate method-----	75
⌘ 25: Revertants colony counts and means obtained with TA 1535 following exposure to TDI or MDI and known mutagens in pour plate method-----	76
⌘ 26: Revertants colony counts and means obtained with TA 1537 following exposure to TDI or MDI and known mutagens in pour plate method-----	77

그림 목차

그림 1: EC 공동체 국가들의 신규화학물질 심사 과정 및 규제-----	10
그림 2: New Chemical Review Process(Standard Review) in USEPA-----	15
그림 3: Organization of NTP-----	21
그림 4: Toxicological Evaluation Process of NTP-----	22
그림 5: Regulations of new and existed chemical substances in Japan-	25
그림 6: A model for a genotoxicity pathway-----	31
그림 7: Frameshift mutations and base-pair substitutions-----	32
그림 8: Current OPP mutagenicity TEST SCHEME-----	36
그림 9: Former OTS Gene mutation TEST SCHEME-----	37
그림 10: Former OTS Chromosome abberation TEST SCHEME-----	37
그림 11: Current OTS mutagenicity TEST SCHEME-----	39

Scheme 목 차

Scheme 1: Preparation of Aroclor 1254 Induced S-9(MF0, P-450s)-----	51
Scheme 2. Subculture of test strain and Cryopreservation of subcultured strain-----	52
Scheme 3. Procedure for Identification of test strain-----	54
Scheme 4: Procedure for Ames test using plate method-----	61
Scheme 5. Overall flow chart for Ames test-----	62

1. 서론

1-1. 환경성 질환의 증가와 화학물질 규제의 필요성

인간의 제반활동에는 상해나 사망과 같은 위험성이 수반된다. 이러한 위험을 야기하는 요인은 광산, 건설, 화재 등과 같이 가시적이며 즉시 나타나는 것도 있지만 화학물질과 같이 비가시적이며 만성적으로 위험성을 가져오는 경우도 있다(Environ 1988). 표 1은 미국에 있어서 위험요인 및 그 확률을 나타낸 것이다. 광산사고나 진폐증, 자동차사고, 화재 등은 정량적으로 또는 정성적으로 그 위험성을 나타낼 수 있으며 아울러 그 방지대책 마련에 정부차원에서 관심을 집중시켜 왔다. 그러나 화학물질의 위험성은 눈에 보이지 않고 만성적으로 나타나므로 정량적으로 표시할 수 없으며 따라서 그 방지대책을 소홀히 해왔다.

작금의 지구의 최대 관심사는 화학물질을 대량으로 다수 사용하고 장기적으로 통제가 어려운 폐기물처리로 인한 직업병과 환경오염문제이다. 1990년 2월 현재 미국화학회의 Chemical Abstract에 등록된 화학물질수는 1957년 이래 1,000만종 이상이며 이중 10만종의 화학물질이 국제적으로 거래되고 있으

표 1. 일반적인 인간활동으로부터 오는 연간 사망위험율¹

	연간 사망자수	연당 개체위험율	평생위험율 ²
광산사고	180	1/770	1/17
진폐증	1,135	1/125	1/3
자동차사고	46,000	1/4,500	1/65
트럭운전사고	400	1/10,000	1/222
추락사고	16,339	1/13,000	1/186
가정내사고	25,000	1/83,000	1/1,190
화학물질사고	추정불가	추정불가	추정불가

1. Hutt. Food Drug Cosmetic Law J. 33. 558-89. 1978

2. 70년 생애, 45년 노동기준

며 매년 1,000여종이 신규화학물질로 제조, 등록되고 있다(American Chemical Society 1990). 유기화합물의 세계 총 생산량은 1950년대 700만톤이었던 것이 1980년대 2조5천만톤으로 사용량이 기하급수적으로 증가하고 있다(UNEP 1988a).

이들은 대부분 유기화합물로서 세계공동체의 사회경제적 욕구를 만족시키는데 사용되어 왔다. 그러나 기업이 생산비 절감과 이윤 극대화를 추구하고 더우기 선진국들이 후진 개발도상국으로 유해물질을 수출함으로써 이들이 인체 및 환경에 미치는 영향을 소홀히하여 직업병은 물론 각종 환경오염을 야기하고 건강을 위협하며 환경질환을 유발하고 있다(UN 1992). 따라서 현대에 있어서는 가시적이며 급성인 병원미생물이나 자연독소에 의한 질환보다는 비가시적이며 만성적인 환경질환이 50%이상을 차지하여 질병의 병인으로서 화학물질을 심각하게 고려하지 않으면 안되는 상황이 되었다(Environ 1988).

화학물질의 위험성은 돌발사고와 만성적 위험성으로 분류된다. 돌발사고는 예전 수은에 의한 미나마타병, 쌀에서 Salad기름을 정제하는 과정에서 PCB가 흡입되어 일어난 카네미오일사건, 인도에서의 미국 다국적 기업인 Union Carbide의 MIC 유출 사고, 제초제 2,4,5-T의 불순물인 2,3,7,8-TCDD에 의한 월남전의 고엽제 사건, 한국에서의 페놀 유출사고등이 있다(Amdur et al 1991). 그러나 더욱 중요시되어야 할 점은 화학물질의 만성적 위험성으로 유전질환, 암, 유전질환, 당뇨병, 심장질환, 신장질환 등 각종 질환이 화학물질에 기인한다는 보고(Amdur et al 1991, Descartes 1986, Hays 1991, NAS 1982)가 증가함에 따라 정부는 물론 민간차원에서도 화학물질에 대하여 경각심을 가지게 되었다.

따라서 환경오염에 의한 인간건강 및 생태계파괴와 작업장에서의 환경질환을 감소시키기 위하여 학문적, 정치적으로 다각적인 노력을 다하고 있다. 학문적으로는 독성학이 화학물질의 안전성시험 및 유해성 평가자료를 마련하고(NTP 1991a, 1991b, OECD 1984, 1987, USEPA 1986a, 1986b, 1986c, 1986d, 1986e, 1986f, 1987, 1988a, 1988b, 1988c, 1989a, 1989b, 1992) 정치적으로

는 독성물질의 국제간 교역규제(UNEP 1991), 사전심사제도(UNEP 1989a, UNEP/FAO 1991), 독성물질 정보교환(UNEP 1988a, 1988b), 신규화학물질 심사 및 기존 화학물질 재평가등과 관련한 각종 법률(USEPA 1983, 유독물질관리협회 1992, 환경처 1991, 日本労働省安全衛生部 化学物質調査課 1990, 化審法 1992)과 협약을 제정하고 있으며(竹中 祐典 1989) 안전성 시험지침과 GLP기준(渡邊 徹 1989)을 발표하여 연구결과와 신뢰성을 확보하는데 주력하고 있다. 1950년대부터 환경화학물질의 부작용에 대하여 널리 알려졌지만 그 유해성은 작업장에 한정되었다. 이후 국가적 국제적 수준에서 학문적 정치적으로 다각적인 노력을 기울여 화학물질 사용 취급시 안전성 향상과 잠재적인 유해성관리를 도모하고 더우기 화학물질의 국제적 거래에 있어 정보교환을 의무화함으로써 잠재적인 유해성을 감소시키려는 노력하고 있으며 브라질 리우회담(UN 1992, 경제기획원 1992)에서는 화학물질의 안전관리를 위한 제반 활동지침을 마련하기에 이르렀다.

1-2. 국제기관 및 각국의 화학물질 규제 활동: 신규 화학물질의 유해성 심사

1-2-1. 유엔의 화학물질 규제활동 :

국제기관으로서 유엔의 산하기관 중 유엔환경계획(UNEP), 유엔노동기구(ILO), 세계보건기구(WHO)등 32개 단체가 화학물질과 관련되어 활동하고 있다(표2, UN 1988). ILO는 국제노동안전보건정보센타를 운영하며 CIS라는 독성자료를 마련하고 있으며 WHO에서는 직업성 암 및 환경성 발암을 집중 연구하는 국제암연구기관(IARC)을 운영하고 있으며 UNEP, ILO와 협력하여 국제화학물질안전성계획(IPCS)를 운영하며 환경보건기준(Environmental Health Criteria), 국제화학물질안전성카드를 작성 보급하고 있다(IPCS 1987). UNEP에서는 농약등 화학물질의 독성정보를 마련하는 국제유독물정보센타(IRPIC)를 운영하고 있으며 1987년 9월 16일 24개국과 EC공동체가 Freon(미국과 EC 60%, 일본 12%, 소련 8%로 총사용량의 80% 이상을 이들이 사용)등 오존층 파괴물

표 2: 화학물질 규제와 관련된 유엔의 기구와 활동

- 1: UNEP(UN Environment Programme, 유엔환경계획)
1972년 창설
IRPTC(Intern. Register. Potentially Tox. Chemicals)
Works closely, in particular, with IPCS
Publications: IRPTC Bulletin: issue twice a year
IRPTC Legal File(1986)
Treatment and Disposal methods for Waste
Chemicals(1985)
Consolidated List of Products whose consumption and/or
sale have been banned, withdrawn, severely restricted
or not approved by governments 1987
GEMS: Global Environ. Monitoring System
INFORTERRA: Intern. Environ. Inform. System
OCAP: Oceans and Coastal Areas Programme
DCP : Desertification Control Programme
- 2: WHO(World Health Organization, 세계보건기구)
1948년 창설
IARC(Intern. Agency for Research on Cancer)
Publications: IARC monographs on the Evaluation of carcinogenic
risks to human
IARC scientific publications
Annual reports(up to 1985) and now Biennial reports
Directory of Ongoing research in Cancer epidemiology
Information Bulletin on the survey of chemicals being
tested for carcinogenicity.
DEH(Division of Environ. Health)
a: Community Water Supply and Sanitation Unit(CWSSU)
b: Food Safety Unit(CSU)
c: Central Unit of the Intern. Programme on Chemical Safety(IPCS)
* IPCS: Intern. Programme on Chemical Safety
Joint or Cooperative programme of UNEP, ILO, WHO(1979)
Publications: Environmental Health Criteria(EHC) series
Health and Safety Guides(HSG)
Intern. Chemical Safety Cards(ICSA)
Medicinal Guides(MG)
d: Prevention of Environmental Pollution Unit(PEPU)
FCMO: Food Contamin. Monitoring Programme-FAO/WHO
Health Legislation Unit
- 3: FAO(Food and Agriculture Organization of UN, 유엔식량농업기구)
1945년 창설
- 4: ILO(Intern. Labour Organization, 유엔노동기구)
1919년 창설
CIS(Intern. Occup. Safety/Health Inform. Centre)
- 5: IMO(Intern. Maritime Organization, 유엔해상운송기구)
1958년 창설

질에 관한 Montreal 의정서(UNEP 1987, 1989b)에 합의하여 1989년 1월 1일 발효시키는데 중추적인 역할을 하였다. 또한 UNEP는 1987년 6월 화학물질의 국제거래에 있어서 수출입국간의 정보교환을 위한 London Guideline(UNEP 1988a, 1988b, 1989a, 1991)을 마련하고 1989년 이중 금지, 제한조치된 화학물질에 대한 사전승인제도(Prior Informed Consent, PIC)를 개정 보완하였다(UNEP 1989a, UNEP/FAO 1991). 1992년 6월 브라질 리우에서 개최된 환경과 개발에 관한 유엔회의(UNCED)에서는 리우선언과 리우선언의 실천계획인 의제 21(Agenda 21)이 채택되어 화학물질의 유해성에 관한 국제적 평가 확대 및 강화, 화학물질의 분류 및 표시의 일원화, 화학물질의 독성정보 교환, 화학물질의 위험성 감축계획 수립, 화학물질의 효과적 관리를 위한 국가적 능력과 시설 강화사용금지 또는 사용제한된 화학물질의 불법적 국제무역 금지등 6개 분야의 화학물질 안전관리를 위한 제반활동을 제안하고 이에 연구자, 정부, 국제기관, 업체의 협력을 협의하였다(UN 1992, 경제기획원 1992).

1-2-2. OECD 및 EC 공동체에 있어서 화학물질 안전대책과 규제활동

OECD(경제협력개발기구)는 가맹국의 경제의 지속적 성장, 다각적 무역의 확대 등을 주목적으로 미국, 일본, 영국, 독일, 프랑스, 캐나다등 선진 24개국이 1960년 설립한 국제기관이다(日本化學物質委員會 1991, 竹中 祐典 1989). . OECD에서의 화학물질 안전성에 관한 활동 안전대책의 강구는 1970년대 전반의 PCB, 수은, 카드뮴의 유해성조사 및 규제에서 시작되었다.

이러한 화학물질 안전대책을 강구하게된 목적은 1) 화학물질의 유해한 영향에 대하여 인간건강 및 환경보호 증진, 2) 화학물질의 무역장벽 철폐, 3) 화학물질 규제에 관련된 가맹국의 경제적 행정적 부담 경감, 4) 화학물질의 국제적 정보교환 강화로 요약된다. 여기서 (1)-(3)의 목적을 수행하기 위한 방법으로서 첫째 화학물질을 시판하기전에 유해성 평가에 필요한 안전성 데이터의 범위를 정하는 것이었는데 이는 1982년 상시전최소시험자료(MPD, Minimum Premarketing Set of Data, 표 3)를 결정하여 미국과 일본을 제외한

표 3: OECD Minimum Premarketing Set of Data(상시전 최소 안전성 평가 항목,MPD)

동정 및 분석에 관한 항목

(1) 동 정

- | | |
|---|------------------------|
| 1. 국제적 명명법에 따른 명칭(IUPAC 명) | 2. 기타 명칭 |
| 3. 구조식 | 4. CAS No. |
| 5. Spectra(Pure or technical grade etc) | 6. Technical grade의 순도 |
| 7. 불순물 명칭 및 함유 비율 | |
| 8. 시판시 사용한 첨가제 및 안정제 명칭과 사용 비율 | |

(2) 분석방법

생산유통에 관한 항목

- | | |
|-----------|-----------|
| 1. 제조예정수량 | 2. 예정용도 |
| 3. 예정폐기방법 | 4. 예상수송형태 |

취급주의 사항: 권장되는 취급주의 및 비상시 취급방법

성상에 관한 항목

(1) 물리화학적성상

- | | |
|----------|------------|
| 1. 응점 | 2. 비점 |
| 3. 밀도 | 4. 증기압 |
| 5. 수용해성 | 6. 분배계수 |
| 7. 가수분해성 | 8. Spectra |
| 9. 흡탈착성 | 10. 해리정수 |
| 11. 입경분포 | |

(2) 분해, 축적성

1. 생분해성(Screening 시험으로서 생분해성: Ready Biodegradability)
2. 생물농축성(Screening시험으로서 생물농축성: 분배계수, 지방용해성, 수용해성, 생분해성)

(3) 생태독성

- | | |
|---------------------|--------------------|
| 1. 어독성(LC 50/96시간) | 2. 물벼룩독성(14일간 번식성) |
| 3. 조류독성(4일간 생장저해) | |

(4) 급성독성

- | | |
|------------------------|-----------|
| 1. 급성경구독성 | 2. 급성경피독성 |
| 3. 급성흡입독성 | 4. 피부자극성 |
| 5. 피부감작성 | 6. 안구자극성 |
| 7. 아급성독성(14-28일간 반복투여) | 8. 변이원성 |

표 4: OECD GLP 기준 (GOOD LABORATORY PRACTICE PRINCIPLES)

1. Test Facility Organisation and Personnel
 - 1.1 Management's Responsibilities
 - 1.2 Study Director's Responsibilities
 - 1.3 Personnel Responsibilities
2. Quality Assurance Programme
 - 2.1 General
 - 2.2 Responsibilities of the Quality Assurance Personnel
3. Facilities
 - 3.1 General
 - 3.2 Test System Facilities
 - 3.3 Facilities for Handling Test and Reference Substances
 - 3.4 Archive Facilities
 - 3.5 Waste Disposal
4. Apparatus, Material, and Reagents
 - 4.1 Apparatus
 - 4.2 Material
 - 4.3 Reagents
5. Test Systems
 - 5.1 Physical/Chemical
 - 5.2 Biological
6. Test and Reference Substances
 - 6.1 Receipt, Handling, Sampling, and Storage
 - 6.2 Characterisation
7. Standard Operating Procedures
 - 7.1 General
 - 7.2 Application
8. Performance of the Study
 - 8.1 Study Plan
 - 8.2 Content of the Study Plan
 - 8.3 Conduct of the Study
9. Reporting of Study Results
 - 9.1 General
 - 9.2 Content of the Final Report
10. Storage and Retention of Records and Material
 - 10.1 Storage and Retrieval
 - 10.2 Retention

표 5: OECD Chemical Test Guideline

제 1 장 Physiochemical properties

- | | |
|---|-----------------------------------|
| 101 UV-VIS Absorption Spectra | 102 Melting Point/Melting Range |
| 103 Boiling Point/Boiling Range | 104 Vapour Pressure Curve |
| 105 Water Solubility | 106 Adsorption/Desorption |
| 107 Partition Coefficient(n-octanol/water) | |
| 108 Complex Formation Ability in Water | 109 Density of Liquids and Solids |
| 110 Particle | |
| 111 Hydrolysis as a Function of pH | |
| 112 Dissociation constants in Water | |
| 113 Screening Test for thermal Stability and Stability in Air | |
| 114 Viscosity of Liquids | |
| 115 Surface Tension of Aqueous Solutions | |
| 116 Fat Solubility of Solid and Liquid Substances | |
| 117 Partition Coefficient(n-octanol/water), HPLC Method | |

제 2 장 Aquatic toxicity

- | | |
|---|-----------------------------|
| 201 Alga, Growth Inhibition Test | |
| 202 Daphnia sp. Acute Immobilisation Test and Reproduction Test | |
| 203 Fish, Acute Toxicity Test | |
| 204 Fish, Prolonged Toxicity Test:14-day Study | |
| 205 Avian Dietary Toxicity Test | 206 Avian Reproduction Test |
| 207 Earthworm, Acute Toxicity Tests | |
| 208 Terrestrial Plants, Growth Test | |
| 209 Activated Sludge, Respiration Inhibition Test | |

제 3 장 Degradability and Bioconcentration

(Ready Biodegradability)

- | | |
|---|----------------------------------|
| 301 A Modified AFNOR Test | 301 B Modified Sturm Test |
| 301 C Modified MITI Test(1) | 301 D Closed Bottle Test |
| 301 E Modified OECD Screening Test | |
| (Inherent Biodegradability) | |
| 302 A Modified SCAS Test | 302 B Modified Zahn-Wellens Test |
| 302 C Modified MITI Test(11) | |
| (Simulation Test) | |
| 303 A Aerobic Sewage Treatment:Coupled Units Test | |
| (Biodegradability in soil) | |
| 304 A Inherent biodegradability in Soil | |
| (Bioconcentration) | |
| 305 A Sequential Static Fish Test | 305 B Semi-Static Fish Test |
| 305 C Degree of bioconcentration in Fish | |
| 305 D Static Fish Test | 305 E Flow-Through Fish Test |

제 4 장 Health Effects

(Short term toxicity)

- 401 Acute Oral Toxicity
- 402 Acute Dermal Toxicity
- 403 Acute Inhalation Toxicity
- 404 Acute Dermal Irritation/Corrosion
- 405 Acute Eye Irritation/Corrosion
- 406 Skin Sensitisation
- 407 Repeated Dose Oral Toxicity-Rodent:28/14-day
- 408 Subchronic Oral Toxicity-Rodent:90-day
- 409 Subchronic Oral Toxicity-Non-rodent:90-day
- 410 Repeated Dose Dermal Toxicity:21-28-day
- 411 Subchronic Dermal Toxicity:90-day
- 412 Repeated Dose Inhalation Toxicity:28/14-day
- 413 Subchronic Inhalation toxicity:90-day
- 414 Teratogenicity
- 415 One-generation Reproduction Toxicity
- 416 Two-Generation Reproduction Toxicity
- 417 Toxicokinetics
- 418 Acute Delayed Neurotoxicity of Organophosphorus Substances
- 419 Subchronic Delayed Neurotoxicity of Organophosphorus Substances: 90-day

(Long term toxicity)

- 451 Carcinogenicity Studies
 - 452 Chronic Toxicity Studies
 - 453 Combined Chronic Toxicity/Carcinogenicity Studies
- ##### (Genotoxicity)
- 471 Salmonella typhimurium, Reverse Mutation Assay
 - 472 Escherichia coli, Reverse Mutation Assay
 - 473 In vitro Mammalian Cytogenetic Test
 - 474 Micronucleus Test
 - 475 In vivo Mammalian Bone Marrow Cytogenetic Test-Chromosomal Analysis
 - 476 In vivo Mammalian Cell Gene Mutation Test
 - 477 Sex-Linked Recessive Lethal Test in Drosophila Melanogaster
 - 478 Rodent Dominant Lethal Test
 - 479 In vitro Sister Chromatid Exchange Assay in Mammalian Cells
 - 480 Saccharomyces cerevisiae, Gene Mutation Assay
 - 481 Saccharomyces cerevisiae, Mitotic Recombination Assay
 - 482 DNA Damage and Repair, Unscheduled DNA Synthesis in Mammalian Cells in vitro
 - 483 Mammalian Germ Cell Cytogenetic Assay
 - 484 Mouse Spot Test
 - 485 Mouse Heritable Translocation Assay

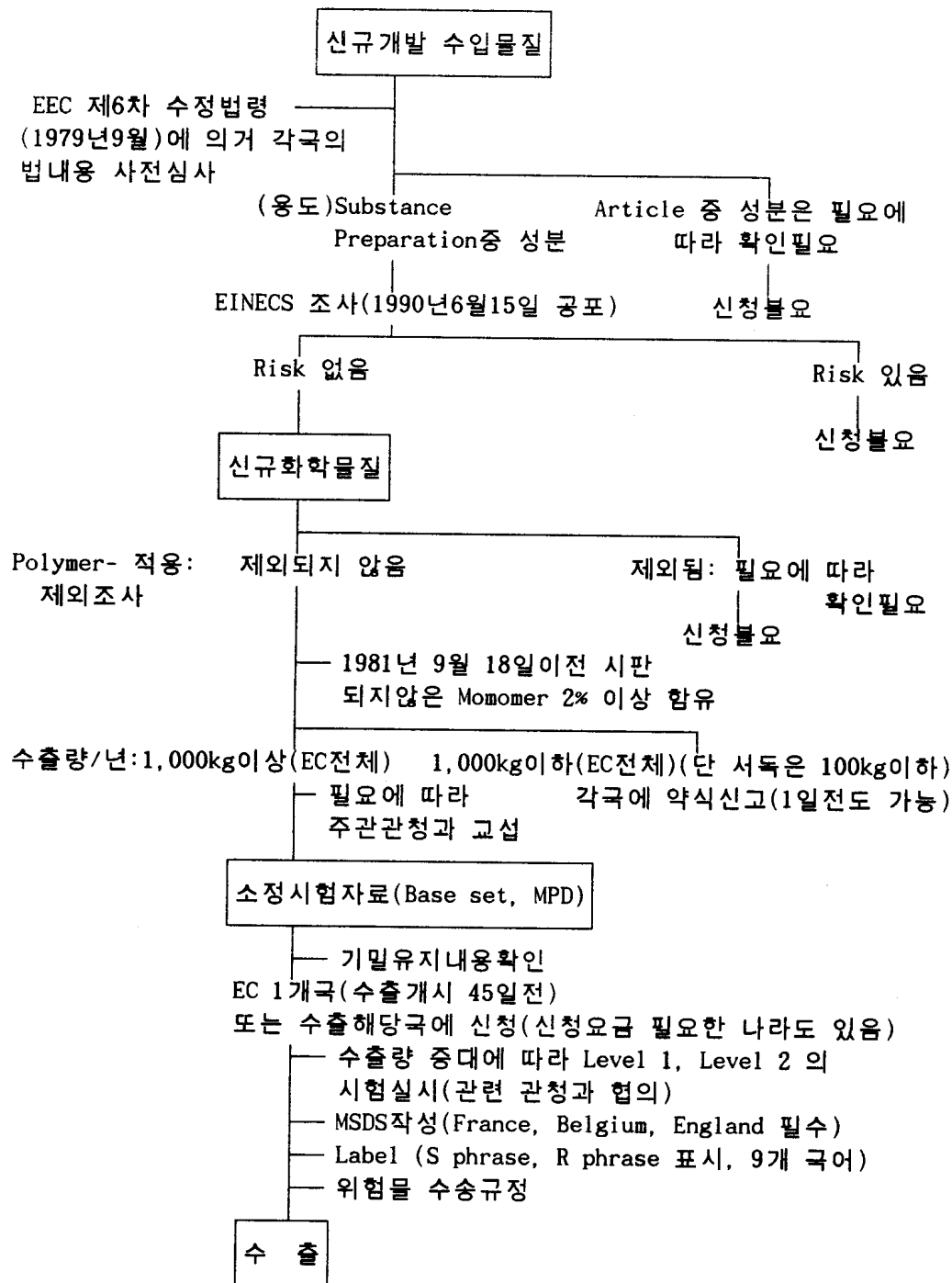


그림 1: EC 공동체 국가들의 신규화학물질 심사 과정 및 규제

OECD 가맹국이 신규화학물질 신고시에 반드시 요구하고 있다(일본도 이를 준수하려는 움직임이 있다). 둘째로 상시전 안전성자료 마련을 위한 독성시험등 각종시험방법을 발표하는 것이었는데 이것도 1981년 51개에서 1990년 5월말 현재 78개의 시험방법을 신규 개정공표하여 화학물질 시험지침서(OECD Chemical Test guideline, 표4)을 발행하고 이에 의거하여 시험된 자료는 국제적으로 인정해주고 있다(OECD 1984, 1987). 세째로 안전성 자료의 신뢰성 확보를 위하여 1981년 이사회 결정사항으로 우량시험소기준(GLP, 표5)을 공표하였으며 마지막으로 안전성 자료의 유해성 평가방법(Risk Assessment)을 마련하는 것이나 이는 미국의 방법을 따르고 있다. 이러한 OECD 이사회 결정사항을 독일등 EC 공동체국가들은 철저히 준수하여 신규화학물질을 심사하고 있다(그림 1).

1-2-3. 미국에 있어서 화학물질 안전대책과 규제활동

미국에 있어서 화학물질 안전대책과 규제활동은 크게 법률제정과 독성연구, 독성시험지침으로 나눌 수 있겠다.

먼저 화학물질 규제와 관련된 법률은 표 6과 같다(Environ 1988). 이 법률들은 화학물질의 위험성평가 결론에 근거하여 그 물질을 규제할 필요가 있는가 규제한다면 어떤 규제방법을 취할 것인가의 정책결정방법에 따라 크게 3가지로 분류된다. 식품의약품화장품법은 건강 및 환경에 대한 위험성만을 고려하며 유해화학물질관리법은 노출된 사람수의 위험성, 환경에 대한 위험성을 계산하고 위험성관리 고려방법에 따라 사회경제적 영향(Benefit, Cost등)의 균형(Balancing)을 강조하고 그리고 노동안전위생법은 건강에 대한 위험성이나 경제사회적 영향보다도(작업환경의) 기술적 개선 가능성(Technical Feasibility)을 우선적으로 고려하여 이용할 수 있는 실행가능한 최선의 위험성 감소 기술을 정하고 이를 이용하여 규제치를 정하며 그 결과 규제치가 일정치 이상이면 다시 감소를 검토할 경우도 있다(Merrill 1991, Oshima 1991, Scala 1991).

⌘ 6: Laws and acts related to exposures to toxic substances and chemical regulation in USA

Law	Admin. Agency	Regulated Products	Regulation Model
FDCAAct	FDA	Food, drugs, cosmetics, food additives, new drugs, animal feed additives, and medical devices	Risk (Food Additives, cosmetics) Balancing(drug/medical devices)
FIFRAAct	EPA	Pesticides	Balancing
AEAct	NRC	Radioactive substances	-
FHSAAct	CPSC	Toxic Housedhold Products	Risk
PPIAct	USDA	Food, feed, color, additives, and pesticide residues in poultry	Risk
OSHAAct	OSHA	Workplace chemicals	Technical Feasibility
PPAct	CPSC	Packaging of hazardous household products	-
CAAct	EPA	Air pollutants	Risk Technical Feasibility
HMTAct	DOT	Transfor of hazardous materials	Risk
CWAct	EPA	Water pollutants	Technical feasibility
MPRSAAct	EPA	Ocean dumping	-
CPSAct	CPSC	Hazardous consumer products	Balancing
SDWAct	EPA	Drinking water contaminants	Balancing
RCRAAct	EPA	Solid waste, including hazardous wastes	Risk
TSCAct	EPA	Hazardous chemicals not covered by other laws, includes pre-market review	Balancing
FMSHAct	DOT	Toxic substances in coal and other mines	-
SARAct	EPA	Hazardous substance, pollutant, and contaminant at waste sites	Risk Technical Feasibility

표 6(계속)

AEAct : Atomic Energy Act(1954)
CAAct : Clean Air Act(1970, amended 1981)
CPSAct : Consumer Product Safety Act(1972, amended 1981)
CWAct : Clean Water Act(formerly Federal Water Control Act, 1972, amended 1977, 1978)
FDCAAct : Food, Drug, Cosmetics Act(1906, 1938, 1960, 1962, 1968)
FHSAAct : Federal Hazardous Substances Act(1960, amended 1981)
FIFRAAct: Federal Insecticide, fungicide and Rodenticide Act(1948, amended 1972, 1975, 1978)
FMSHAct: Federal Mine Safety and Health Act(1977)
HMTAct : Hazardous Materials Transportation Act(1972)
MPRSAAct: Marine Protection Research and Sanctuaries Act(1972)
OSHAAct : Occupational Safety Health Act(1970)
PPIAct : Poultry Products Inspection Act(1968)
PPPAAct : Poison Prevention Packaging Act(1970, amended 1990)
RCRAAct : Resource Conservation and Recovery Act(1976)
SARAAct : Superfund Amendments and Reauthorization Act(1986, formerly Comprehensive Environmental Response, Compensation, and Liability Act of 1980)
SDWAct : Safe Drinking Water Act(1974, amended 1977)
TSCAAct : Toxic Substances Control Act(1976)
CPSC : Consumer Products Safety Commission
DOT : Department of Transportation
EPA : Environmental Protection Agency
FDA : Food and Drug Administration
NIOSH : National Institute of Occupational Safety and Health
NRC : Nuclear Regulatory Commission
OSHA : Occupational Safety and Health Administration
USDA : U.S. Department of Agriculture

TSCA는 신규화학물질 및 기존화학물질의 유해성을 심사하고 관리할 권한을 EPA에 준 법률이다(USEPA 1983). 농약 및 신규공업화학품등은 새로 제조 시판할 경우 신고하여 심사받는다(제조전 신고, 제조전심사제도). 보통 예정된 시험 자료를 제출하여 위험성평가를 행한 다음 인허가된다. 신규공업화학물질의 사전심사제도는 일본을 시작으로 미국(TSCA 5조), EC 12개국(제 6차 수정지령), Swiss, Austria, Finland, Australia에서 시행되고 Sweden, Norway, Canada, 한국도 시행중이다. EPA는 TSCA 4조에 의거 기존화학물질의 인간건강 및 환경영향에 관한 시험자료를 요구한다. 요구되는 시험항목은 OECD가 권고하는 MPD와 유사하다. 또한 TSCA 5조(a)항은 미국에서 새로이 제조되거나 미국으로 처음 수입되는 화학물질을 취급하는 사업주는 화학물질의 인간건강 및 환경에 미치는 각종자료를 제출하여야 한다는 조항으로서 이것이 제조권신고(Premanufacture Notice, PMN)이다(USEPA 1989b, 日本化學物質安全情報 Center 1990, 日本化學物質委員會 1991). 신고된 화학물질은 90일간의 유해성심사를 거쳐 5조(e)항과 (f)항에 의거 제조허가되거나(NOC), 완전히 제조금지되거나 생산제한되어 제조허가(Consent Order)되거나 일정 시험을 거친 후 재심사하는 등의 규제를 받는다(그림 2). 1990년 2월까지 총 14521건이 신고되었으며 이중 1615건이 규제된 신규화학물질이다(표 7)(Culleen 1991).

신규화학물질의 유해성 심사 방법은 구조활성관계(SAR)에 근거한 접근법(SAR based approach)과 노출량에 근거한 접근법(Exposure-based approach)이 있다(日本化學物質委員會 1991). 미국은 OECD 가맹국임에도 불구하고 MPD를 준수하지 않고 있으며 EC공동체나 일본의 경우와는 달리 신규화학물질신고시 규정된 독성자료의 범위는 정해져 있지만 시험자료를 요구할 강제성은 없다. 따라서 미국에서 새로이 제조되거나 외국에서 새로이 제조 수입되는 화학물질의 경우 인간건강 및 환경영향을 평가할 자료가 부족하므로 주로 구조활성관계에 근거하여 심사한다. 그러나 Acrylamide등의 구조와 유사한 화학물질은 엄격히 제한되고 있으며 현재 Isocyanate등 20개의 구조 Categories가 제안되어 있다(표 8). 한편 외국에서 다량 장기간 사용되어 온 화학물질이 수입되

는 경우는 이들의 자료를 엄격히 요구한다(Culleen 1991, 日本化學物質委員會 1991).

또 다른 심사방법은 노출량에 근거한 접근법으로서 연간 100,000kg이상 생산되는 화학물질의 경우 근로자 폭로량 및 인간건강 영향 자료(유전독성시험 자료로서 Ames test와 생쥐의 골수세포를 이용한 In vivo Micronucleus test, 일반독성자료로서 흰쥐를 이용한 28일 아급성경구독성 및 급성경구독성)과 환경영향자료(96시간 조류급성독성, 48시간 물벼룩 급성독성 및 96시간 어류급성독성시험 자료)를 요구한다(표9). 1988년 2월이후 90년까지 55개 물질이 심사되었다(Culleen 1991, 日本化學物質委員會 1991).

표 7: Statistics through fiscal year 1990 Pursuant to TSCA 5(a).

DATA on Submissions:	
PMN Submissions(since 1979)	14,521
TMEA Exemptions(since 1979)	522
Low Volume Exemptions(since 1985)	1,662
Polymer Exemptions(since 1985)	1,371
Total New Chemical Submissions	18,076
Data on Regulatory Actions	
Section 5(e) Orders Issued(# of PMNs)	522
Section 5(f) Actions Issued	4
Withdrawn in Face of Action	738
Upfront(Voluntary) Testing Actions	351
Total cases Regulated	1,615
Notices of Commencement of Manufacturer	
NOC's Received	6,449
As % of Cases(PMN's) Reviewed	41%
Data on 5(e) Exposure-Based Policy	
Signed Consent Orders(Since 2/88)	55
Prenotice Consultations	
Average Per Year	1,200

그리고 생산량 추이를 알아보기 위하여 PMN제출자 이외의 제3자가 제조가 공할 때는 신고해야 한다는 중요신규이용규칙(Significant New Use Rule, SNUR)을 발효시켰다(USEPA 1991, 日本化學物質安全情報 Center 1990, 日本化學物質委員會 1991). 기존화학물질의 위험성관리 즉 인가된 물질에 대한 재검토를 위한 System도 존재한다. 이상을 종합하여 볼 때 미국의 경우 신규화학물질 신고시 규정된 독성자료 범위가 없다는 것이 흠이지만 노출량에 따라 엄격 심사한다는 점과 일본이나 한국의 산업보건법에서의 유해성심사를 환경보호청에서 일괄 처리한다는 점 및 기존화학물질 재심사가 엄격하다는 장점이 있다.

한편 미국 과학원/(미국 국립연구회의)는 1983년 Risk assessment in the Fedeval Government: Managing the Process(NSA/NRC 1983)라는 제목의 화학물질 위험성평가에 관한 보고서를 발간하여 건강영향을 나타내는 확률을 추정하는 위험성평가와 이에 근거한 정치경제문화적 요인을 고려한 화학물질의 규제

표 8: 미국에서 엄격히 심사되는 화학구조 Categories
(PROBLEM CHEMICAL CATEGORIES)

ACRYLAMIDES	ACRYLATES/METHACRYLATES
ALIPHATICAMINES	ALKOXYASILANES
ANIONIC SURFACTANTS	CATIONIC DYES
DITHIOCARBAMATES	EPOXIDES
HINDERED AMINES	HYDRAZINES AND RELATED COMPOUNDS
ISOCYANATES	NEUTRAL ORGANICS
NONIONIC SURFACTANTS	PEROXIDES
POLYCATIONIC POLYMERS	POLYCATIONIC POLYMERS
QUATERNARY AMMOUNIUM SURFACTANTS	SOLUBLE ZINC COMPOUNDS
SUBSTITUTED TRIAZINES	VINYL SULFONES

II 9: Summary of Exposure-Based Criteria(All non-polymer PMN chemicals with estimated production volumes greater than or equal to 100,000 kilograms per year)

Exposure Criteria	Description of Criteria
1. SUBSTANTIAL OR SIGNIFICANT HUMAN EXPOSURE	
1-1 WORKER	
o High number of workers exposed	>=1,000 workers exposed
o Acute worker exposure	>=100 workers exposed by inhalation to >=10mg/day
o Chronic worker inhalation	>=100 workers exposed to 1-10 mg/day for >=100 days/year
	>=250 workers exposed by routine dermal contact for >=100 days/year
1-2 CONSUMER	
o Consumer exposure	Presence of the chemical in any consumer product where (1) the Physical state of the chemical in the product and (2) the manner of use would make exposure likely.
1-3 AMBIENT GENERAL POPULATION	
- Significant exposure	
o Ambient surface water exposure	>=70 mg/year of exposure via surface water
o Ambient air exposure	>=70 mg/year of exposure via air
o Ambient groundwater exposure	>=70 mg/year of exposure via groundwater
- Substantial exposure	
o Aggregate ambient exposure through surface water, air, and groundwater(where leaching from landfill is expected)	>=10,000 kg/year release to environmental media
1-4 Testing Requirements: For those PMN substances meeting significant or substantial human exposure criteria and warranting testing as determined by the Agency, chemical manufacturers may be asked to perform some or all of the following health "core" tests on the PMN substance:	
1) Ames assay 2) Mouse micronucleus 3) 28-day oral toxicity	
4) Acute oral toxicity	
2. SUBSTANTIAL ENVIRONMENTAL RESEASE	
2-1. SURFACE WATER	
SurFace water release	>= 1,000kg/year total release to surface water with calculated estimates after wastewater treatmen
2-2 Testing Requirements:For those PMN substances meeting the substantial environmental release criterion and warranting as determined by the agency, chemical manufacturers may be asked to perform some or all of the following environmental "core" tests on the PMN substance:	
1) Algal acute toxicity 2) Daphnid acute toxicity 3) Fish acute toxicity	

조치를 결정관리하는 위험성관리를 분리함과 아울러 각 연방규제 관청은 위험성평가의 Consistency과 기술적 자질을 보증하고 위험성관리와 분리하여 위험성 평가과정이 과학적이도록 하기 위한 참고지침 “inference guideline”을 채택할 것을 권고하였다. 이 보고서의 고찰방법은 미국 환경보호청뿐만 아니라 유엔 각 기관에서 채용하고 있는데 위험성평가의 경우 유해요인의 확인(Hazard Identification), 용량반응평가(Dose Response Assessment), 노출량평가(Exposure Assessment), 위험성 판정(Risk Characterization)등 4단계로 수행할 것을 제안하였다(Environ 1988, Merrill 1991, Scala 1991).

각 독성별 평가지침(Assessment Guideline)인 참고지침의 경우 각 부처별로 발표하고 있는데 계속 수정되고 있다. USEPA는 1986년 발암성물질(USEPA 1986a, 1988c), 변이원성물질(USEPA 1986b), 화학물질 혼합물의 건강영향(USEPA 1986c), 발육독성이 의심스런 물질의 건강영향(USEPA 1986d), 노출평가(USEPA 1986e, 1992) 등 5개의 평가지침을 발표하고 1988년 여성(USEPA 1988a) 및 남성생식독성(USEPA 1988b) 평가지침을 발표하였으며 신경독성, 면역독성, 폐독성 평가지침도 발표할 예정이다. 또한 신규 및 기존화학물질 심사에 제출되는 독성시험 항목을 제한하여 비용절감은 물론 평가의 일관성을 유지할 목적으로 미국의 각 부처는 시험지침(Testing Guideline)을 발표하고 있다. EPA의 경우 1987년 개정하였으며((USEPA 1987)) 변이원성 시험지침은 1991년 2월 새로 개정되었다(Dearfield 1991).

미국에서 화학물질 규제활동에 있어서 특이한 점은 기존 화학물질의 규제를 위한 독성연구가 기업체뿐만 아니라 정부 연구소에서 체계적으로 추진되고 있다는 점이다. 특히 70년대 후반 화학물질 규제 관련법이 제정됨에 따라 연방 각 성청은 시험법을 개발하고 독성연구를 추진하지 않으면 안되었다. 그러나 이러한 시험추진계획은 한정된 영역에 국한되거나 노출경로를 무시하거나 성청에 관련된 독성만을 추진하여 독성연구가 성청간에 중복되는 현상을 빚었다. 따라서 독성연구자료를 기반으로 행정적 규제를 효율적으로 하고 화학물질의 독성 연구에 관여된 인력과 자원을 통합하여 이제까지 각 연방정부

의 관청에서 행하던 미국연방정부의 독성연구를 국가가 전체적으로 종합적으로 추진한다는 취지로 1978년 11월 보건후생성(DHHS)은 미국국가독성계획(National Toxicology Programme, NTP)를 설립하였다(NTP 1991a, 1991b). 이 기관은 1). 화학물질의 독성정보를 확대하고 2). 허용된 예산내에서 시험될 화학물질의 수를 늘리며 3). 규제당국의 필요에 맞춘 일련의 우수한 표준적인 시험방법을 개발하고 유효성을 확인함으로써 독성연구를 효과적으로 추진하며 4). 정부기관, 연구단체, 기업체 및 국민에게 독성시험계획과 그 결과를 홍보한다는 4가지 목표아래 현재에도 활발히 활동하고 있다. 1990년에 있어서 NTP를 구성하는 연구단체는 보건후생성 산하 5개 기관으로 국립보건원(NIH) 산하 국립암연구소(NCI)와 국립환경보건과학연구소(NIEHS), 식품의약국(FDA) 산하 국가독성연구센터(NCTR), 유해물질 및 질환 등록청(ATSDR) 그리고 질병관리센터(Centers for Disease Control, CDC) 산하 국립로동안전보건연구소(NIOSH)이로 미국연방정부기관내에서의 화학물질의 독성 연구(의약품의 안전성, 환경독성, 산업독성등) 일체를 수행후원하고 있다(그림 3).

1차 독성계획심사는 NTP Executive Committee가 하며 NTP Board of Scientific Counselors가 1차 독성자료심사를 담당한다. 독성계획의 운영은 그림 4에 나타낸 바와 같이 CEC가 작성한 시험우선순위(Priority List)에 의거 시험물질을 선택하고 독성연구를 계획하고 실시하여 기존 화학물질의 독성자료를 마련한다. 1987년부터 1991년까지 NIEHS, NIOSH, NCTR의 시험예산중 대부분은 NIEHS가 차지하고 있으며 순수독성연구, 독성시험방법개발, 독성시험방법의 유효성에 관한 독성 시험이 진행되고 있으며 대부분 순수독성연구이다. 독성분야별로는 세포유전독성, 면역독성, 발암성, 폐독성, 생식발생독성, 신경독성이 주요분야이다. 한편 유해물질관리등록청(Agency for Toxic Substances and Disease Registry, ATSDR)는 1986년 개정된 Superfund 법에 의거 건강환경 유해성 화학물질 275개 각각에 대하여 독성정보를 편집한 Toxicological profile을 발행하고 있다(ATSDR 1991a,

그림 3: Organization of NTP

National Toxicology Program (NTP)

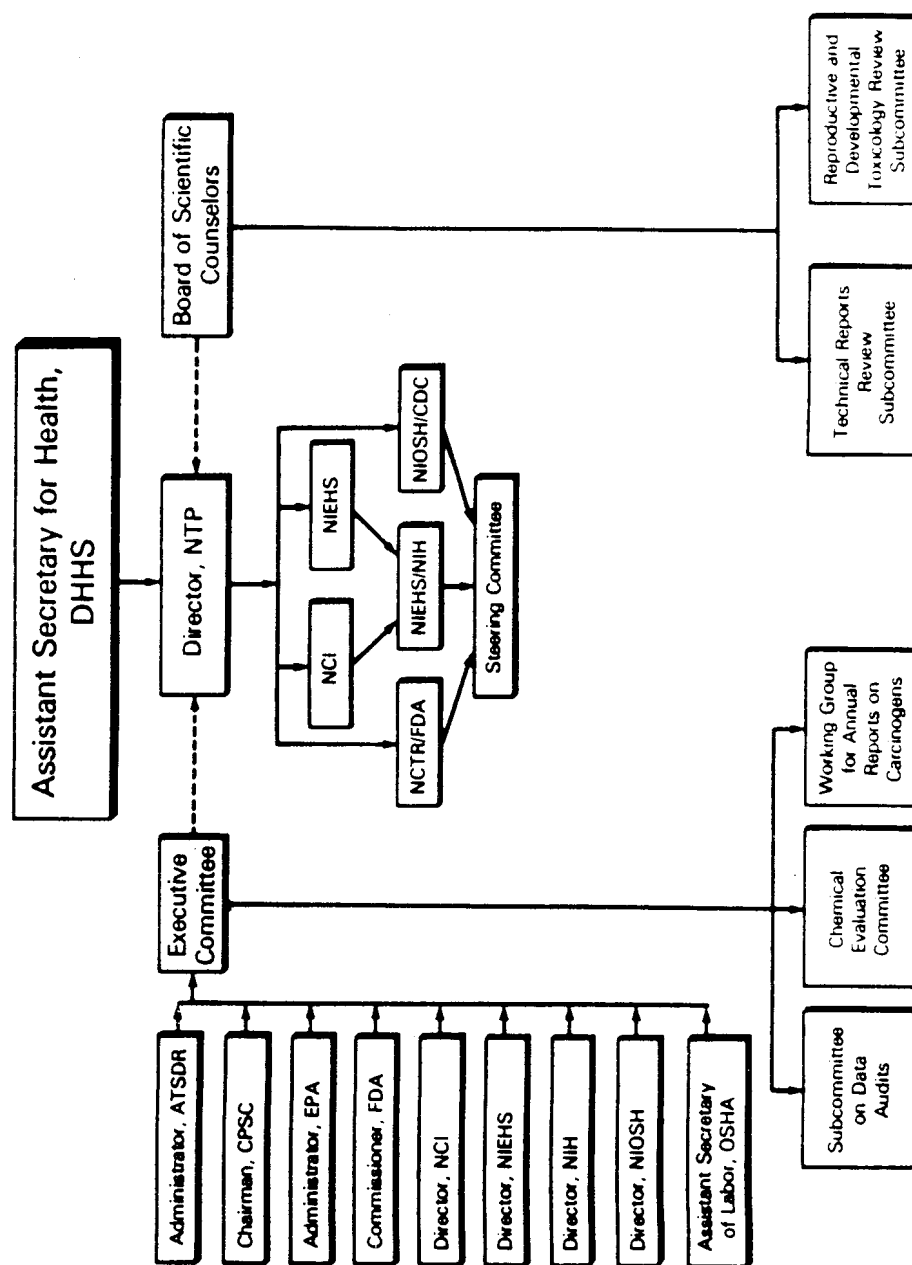
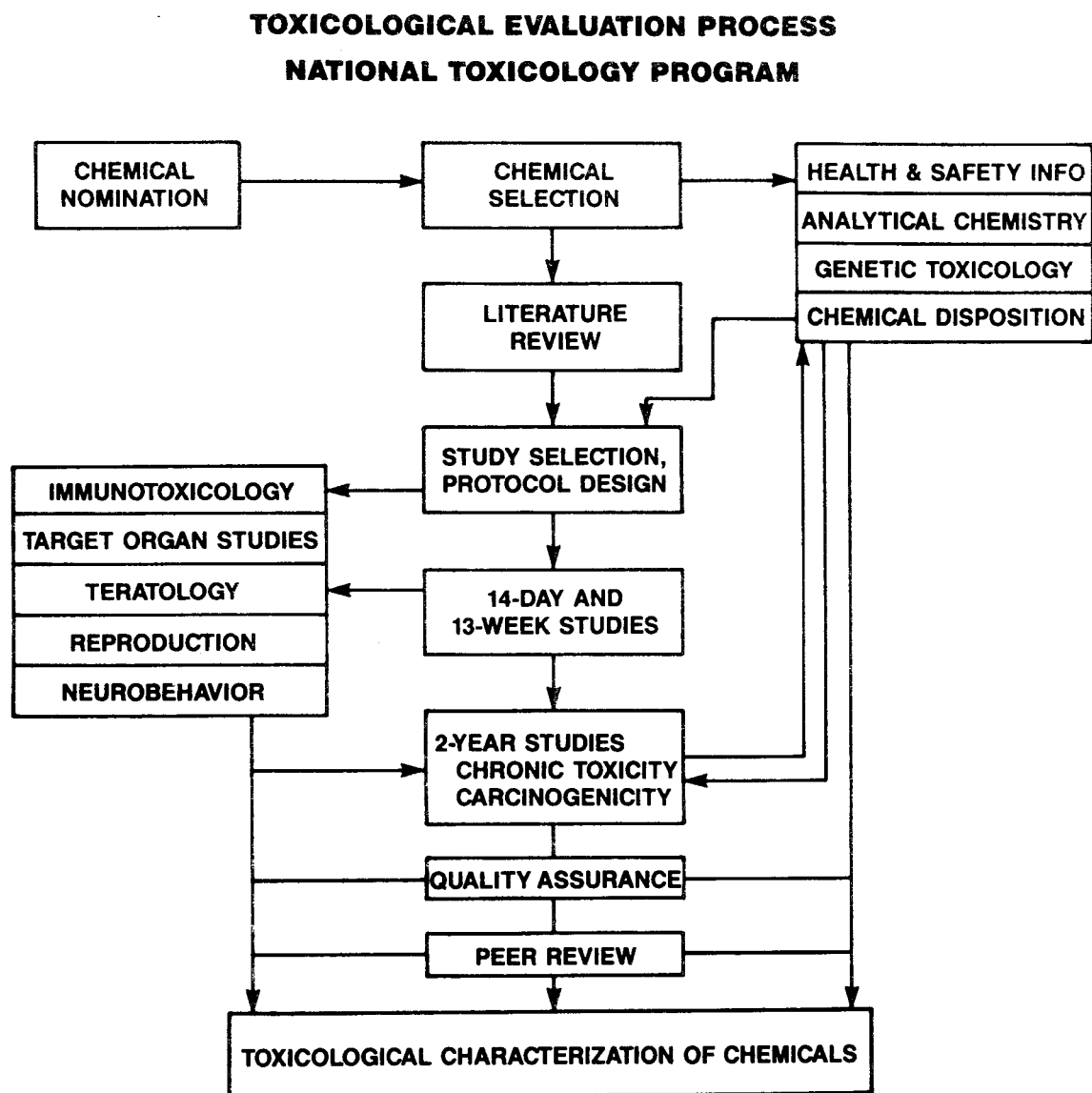


그림 4: Toxicological Evaluation Process of NTP



1991b, .ATSDR/EPA 1987a, 1987b, 1988, 1989, 1990, 1991a, 1991b)

1-2-4. 일본에 있어서 화학물질 안전대책과 규제활동

일본에 있어서 화학물질 규제의 대부분은 화학물질 심사 및 제조 등에 관한 법률(화심법)과 노동안전위생법에 의한다(Kazama 1991, 労働省化学物質調査課 1991, 日本化学物質委員会 1991, 日本労働省安全衛生部 1990, 化審法 1992. 화심법은 환경을 통한 인간에의 독성을 중시하며 신규 및 기존화학물질을 관리한다. 일본에서는 화학물질을 안전화학물질, 지정화학물질, 제1종 특정화학물질, 제2종 특정화학물질로 분류되는데 이는 그림 5에서와 같이 신규화학물질 독성자료 심사결과에 따라 다르다. 환경을 통한 인간에의 유해성에 주목하여 신규화학물질 생분해성과 생물농축성을 우선적으로 평가하고 생분해성이 높으면 안전화학물질로 고시하여 시판하며 생분해성이 낮고 생물농축성이 있으면 모든 독성검사를 요구하고 제1종 특정화학물질로 규정하여 생물농축성이 없으나 분해성이 낮으면 Ames test, 염색체이상시험, 28일 아급성독성등 독성시험을 실시하며 균돌연변이 결과만이 양성(Strongly positive: >1000 revertants/ mg)일 경우 지정화학물질로 분류되지 않으나 아급성독성의 Non observed effect level(NOEL)이 10mg/kg이하이고 2개의 변이원성 시험이 양성인 경우와 2 개의 변이원성 시험결과가 강한 양성(균돌연변이의 경우 1000 revertants/mg, 염색체이상시험의 경우 관찰세포의 20%가 이상을 보이는 농도인 D20이 0.1 mg/ml이하인 경우)으로 유해판정된 경우 지정화학물질로 분류된다(목명수 1992). 지정화학물질은 만성독성 생식/최기형성, 발암성등 시험을 행하여 양성일 경우 제2종 특정화학물질로 분류되어 사후관리 된다.

미국과는 달리 일본에서는 인간에 직접 노출되는 화학물질은 노동안전위생법에 의거 유해성심사를 받는다. 신규화학물질의 신고하는 자는 법에 의거 “변이원성시험, 화학물질의 발암성을 예측할 수 있는 변이원성시험 또는 2년 발암성시험 자료”를 제출해야 한다(노동안전위생규칙 34조3항)고 규정하여 유전독성물질과 발암성물질을 동시에 추정선별하여 엄격히 규제하고 있다.

또한 일본의 각 성청은 시험지침(Testing Guideline)을 발표하고 있으며 신규 및 기존화학물질의 규제를 위한 독성연구를 수행할 국립위생시험소, 국립암센터, 국립공중위생원, 국립예방위생연구소, 국립공해연구소, 산업의학종합연구소, 산업안전연구소, 일본바이오아세이연구센터등 연구소를 운영하고 있으며 (재)일본의약정보센터, (재)국제의약정보센터, 일본중독정보센터, (사)일본화학물질안전정보센터등 사실기관이 화학물질의 독성정보를 자세히 제공하는 활동을 하고 있다(竹中 祐典 1989). 표 10은 미국, 일본, EC공동체에서의 신규화학물질 심사와 관련된 법령의 특징을 요약한 것이다(日本化學物質委員會 1991).

1-2-4. 한국에 있어서 화학물질 안전대책과 규제활동

한국에서의 화학물질관리 관계 법령은 표 11에 나타난 바와 같다. 여기서 신규 및 기존화학물질의 유해성 심사는 현재 유해화학물질관리법(환경처)과 산업안전보건법(노동부)에 의거 수행된다. 신규화학물질을 신고하려는 자는 유해성심사에 필요한 화학물질의 독성등에 관한 자료를 제출해야 하는데 유해화학물질관리법에서는 급성독성, 변이원성, 분해성자료를 반드시 요구하며 잔류성, 농축성, 수생생태독성 등 장관이 필요하다고 인정하는 자료를 요구한다(환경처 1991). 92년 개정된 산안법 시행세칙 제83조 규정에 의하면 신규화학물질의 유해성조사에 필요한 시험은 “미생물을 이용한 복귀돌연변이 시험과 포유류 배양세포를 이용한 염색체 이상시험 또는 이와 동등이상의 결과를 얻을 수 있는 시험이나 발암성시험”이라 하고 있으며 노동부고시 92-25호 신규화학물질 유해성조사 및 심사기준안 제3절 31조에 의하면 미생물을 이용한 복귀돌연변이시험 및 포유류 배양세포를 이용한 염색체 이상시험과 이외 동등이상의 결과를 얻을 수 있는 시험”은 소핵시험, 우성치사시험등 포유동물 개체의 생식세포를 이용하는 변이원성시험 등으로한다고 규정하고 있으나 미국이나 일본의 경우와 달리 본 조항의 취지가 유전독성물질을 규제하기 위한 것인지 발암성물질을 규제하기 위한 것인지 불분명하므로(USEPA 1986b, 労働省

그림 5: Regulations of new and existed chemical substances in Japan

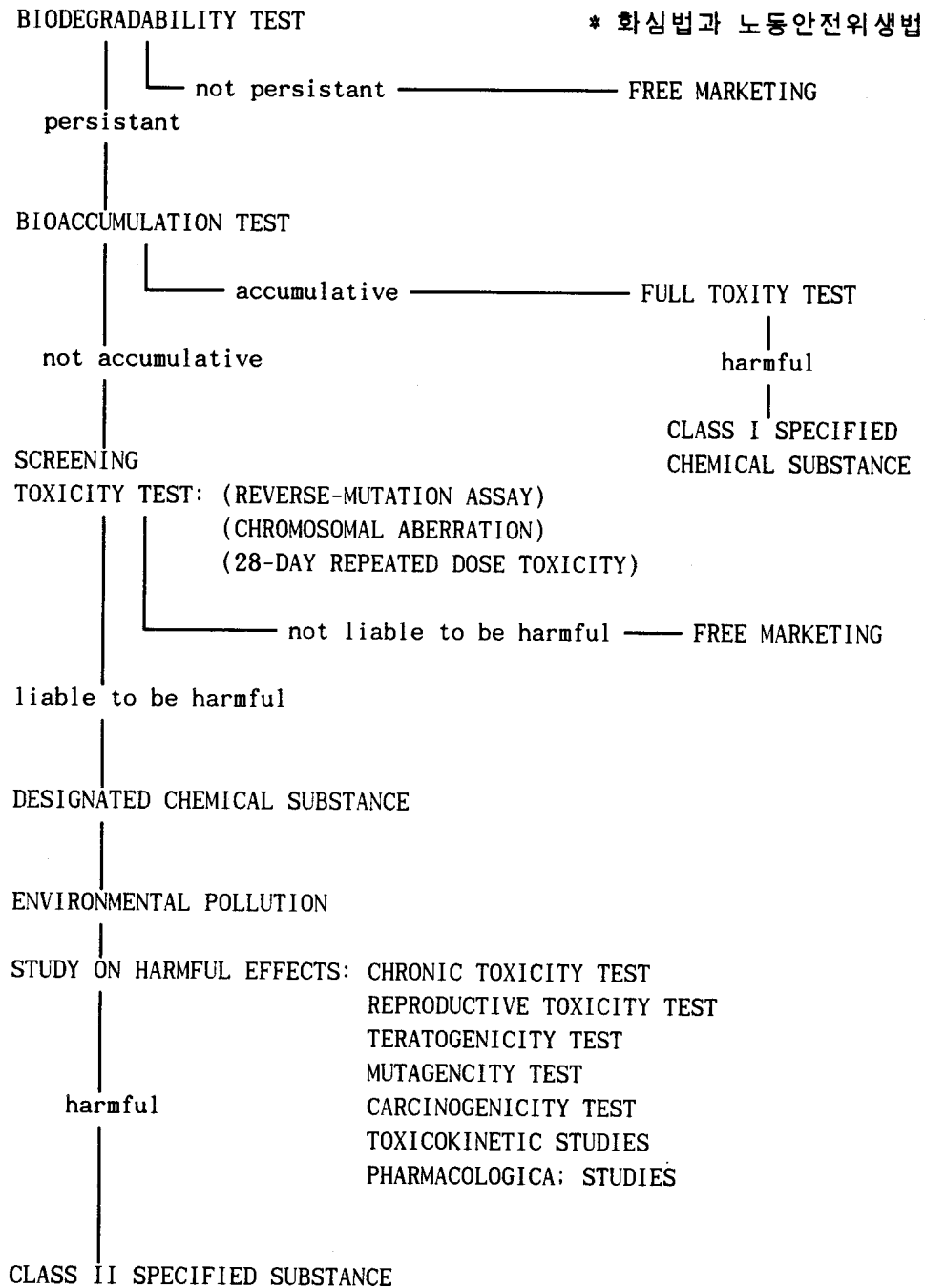


표 10: 개성화심법(일본), TSCA(미국), EC제국의 법 비교

	일본	미국	EC제국
법	개정화심법	TSCA	6차수정지령
목적	환경을 통한 인간영향	환경 및 인간에 영향	환경 및 인간에 영향
기존화학물질 목록 수	약 2만	약 6만	약 9만 5천
신규화학물질 신청시기	제조수입 3개월전	제조수입 90일전	상시 45일전
신규화학물질 신고시 시험항목	지정됨	지정없음	OECD, MPD
GLP	있음	있음	있음
평가	신청자료에 의거 심사	물질심사후 추가 자료 요구	추가시험 요구
생산량에 의한 추가시험	규정없다	규정있다('91)	규정있다
규제조치	있다	있다	있다
유해성조사 지시	기존화학물질 포함	기존화학물질만	규정없음
기존화학물질규제	있음	있음	있음

化學物質調査課 1991, 化審法 1992) 일본이나 미국에서와 같이 차세대 독성 (유전독성)을 예측할 수 있는 변이원성시험은 물론 in vitro 발암성 예측시험이나 2년 발암성시험 자료가 요구될 수 있도록 법령, 시행규칙등이 반드시 개정할 필요가 있다. 또한 국립환경연구원, 국립보건안전연구원, 화학연구소, 산업보건연구원등 연구소에서 화학물질의 규제에 필요한 독성연구에 전념하고 있으나 아직 초보적인 단계이다.

그러나 화학물질의 안전성 평가를 위한 과학적인 정보자료와 입수된 자료를 평가할 인력이 부족하고 화학물질의 안전성 시험체계와 심사체계가 초보적인 단계이며 이로 인하여 유해화학물질의 관리규제를 위한 훈련된 인력과 법적규제가 불완전하여 화학물질과 화학물질 관련산업이 안전성기준없이 수입되어 환경공해는 물론 환경질환에 대한 우려가 점증하고 있으며 더우기 신규화학물질이 대부분 새로 제조된 것이 아니라 수입되는 한국의 상황을 고려할 때 (목명수 1992, 유독물관리협회 1992) 우선적으로 한국에서의 화학물질규제에 관련된 법은 미국, 일본 및 EC공동체에서의 기존화학물질 유해성심사에 필요한 안전성시험항목들을 요구하도록 강화하여야 선진제국의 화학물질공해산업의 수출행각을 방지할 수 있을 것이다. 아울러 행정부는 독성연구를 체계적으로 수행할 범국가적 독성연구기관을 설립하는데 주저하지 말고 또한 화학물질의 위험성관리는 각 부처가 담당할지라도 전문성이 요구되는 화학물질 유해성 심사는 물론 위험성평가는 현재 환경처, 노동부등으로 분열되어있는 상태를 지양하여 일원화함으로써 화학물질의 안전성 평가를 위한 과학적인 정보자료와 입수된 자료를 평가할 인력을 정예화하고 화학물질의 안전성 시험체계와 심사체계를 강화할 필요가 있으며 화학물질 취급 사업주는 유해화학물질의 위험성을 연구하는 선진국의 경우와 같은 관심은 기울일 수 없을지라도 환경질환의 예방을 위한 제반 활동을 철저히 하고 정부와 연구자들의 노력에 협력하는 자세를 가져야하고 독성연구자는 화학물질의 독성기전을 숙지하고 행정부의 정책결정에 도움이되며 규제에 필요하여 요구된 연구과제의 수행에 적극 호응하여 독성자료 마련에 노력하는 자세를 가져야하며 독성에 관련된 부서에

표 11: 한국에서의 화학물질관리 관계 법령

No	법률명	대상분야		목 적	대상물질
1	유해화학 물질관리법	화학 물질 의 제조 · 사용	제조, 수입 판매, 사용	국민보건 및 환경 보전-유해성 심사 적정관리	일반화학물질 (유독물, 특정유독물)
2	농약관리법		제조, 수입 판매, 사용	국민건강보호 생활환경 보전	농약
3	약사법		제조, 수입 취급	의약품등의 품질 유효성 안전성의 확보	의약품, 의약부 외품, 화장품, 의료용구
4	마약법		수출입, 제조 취급	보건위생상의 위해방지	마약
5	항정신성의 약품관리법		수출입, 취급	보건위생상의 위해방지	각성제
6	대마관리법		수출입, 취급	재배, 취급단속	대마
7	오존층보호를 위한 특정물 질제조규정등 에 관한 법률		제조, 수입 사용	대체물질개발이용 배출억제	오존파괴물질 (특정물질)
8	환경정책 기본법	환경 관계	환경, 배출	국민건강보호, 생활환경 보전	인간건강 및 생활환경에 영향 을 주는 물질 (환경기준)

No	법률명	대상분야		목 적	대상물질
9	대기환경 보전법	환경 관계	배출	국민건강보호, 생 활환경보전, 피해 자의 보호	사업활동에 따라 배출되는 매연, 자동차 배출가스
10	수질환경 보전법		배출	국민건강보호, 생 활환경보전, 피해 자의 보호	공공용수역에 배 출되는 배수
11	해양오염 방지법		배출	해양오염 방지 (해양환경보전)	폐유, 폐기물
12	폐기물 관리법		배출	자연생활환경보전 보건위생 향상	일반폐기물 특정 폐기물
13	하수도법		배출	공중위생의 향상	하수
14	광산보안법		광물생산	보안, 광해방지	가스, 분진, 광수, 광재, 폐수, 매연
15	수도법	위생 관계	환경위생	공중위생의 향상 생활환경개선	수도수
16	식품위생법		식품위생 (제조, 판매)	공중위생의 향상	식품, 식품첨가물
17	산업안전 보건법		근로자의 안전위생	근로자의 안전과 건강의 확보	작업장에 폭로되는 화학물질
18	진폐 예방과 진폐 노동자 보호등에 관한 법		근로위생	근로자의 건강보호	분진

근무하는 화학물질규제관리자는 현대에 있어서 행정규제관리는 독성연구는 물론 각종 연구분야를 재배 통제한다는 시류를 인식하고 독성전문가가 되지 않으면 안된다는 것도 배제하지 않는다(Environ 1988, UN 1992).

1-3. 유전독성

화학물질에 의한, 암 등 당대에 걸친 유전 질환을 유발하는 체세포(Somatic cell)에서의 유전자 상해(발암성)는 물론 차세대에 유전질환을 유발하는 생식세포(Germ cell)에서의 유전인자 상해(유전독성)은 독성학 분야에서 관심을 모으는 부분이다. 특히 현재 인간질환의 10%가 Gene과 Chromosome의 조성, 배열, 총량이상등 유전이상과 관련되어 신체기형이나 기능부전을 야기하는데 Down and Klinefelter Disease, Cystic fibrosys, Hemophilla, Sick cell anemia, Achondroplastic dwarfism, Hypercholesteremia, Hypertention, Pyloptic stenosis, Glaucoma, Allergics, Cancer, Mental retardation이 대표적 유전질환이다(NAS 1982, USEPA 1986b). 따라서 현재 Potential human germ cell mutagen과 Potential human carcinogen을 규명하는 연구가 활발히 진행되고 있으며 이들을 엄격히 규제하고 있다(Dearfield 1991).

유전자 상해는 Gene mutation, Chromosome abberation, Chromosome의 수적 구조적 변화로 분류되는데(그림 6), 표 12에 나타난 바와 같이 여러 시험법이 확립되어 있다(OECD 1987, 石官 基 1991). Gene mutation은 Gene내 DNA Sequence의 변화를 의미하며 Base pair substitution과 Frame shift(insertion, deletion)이 있다. Base pair substitution은 예를들면 G:C가 A:T로 치환되고 Frame shift는 이들이 삽입결손되어 아미노산 조성이 변화한다(그림 7)(Brusick 1991, Hoffmann 1991).

표 13은 각국에 있어서 유전독성 시험을 요구하는 법을 나타낸 것이다. 미국에 있어서는 화학물질의 유전독성에 관하여 USEPA가 주도하고 있는데 USEPA는 1986년 Mutagencity risk assessment guideline(USEPOA 1986b)를 발

그림 6: A model for a genotoxicity pathway.

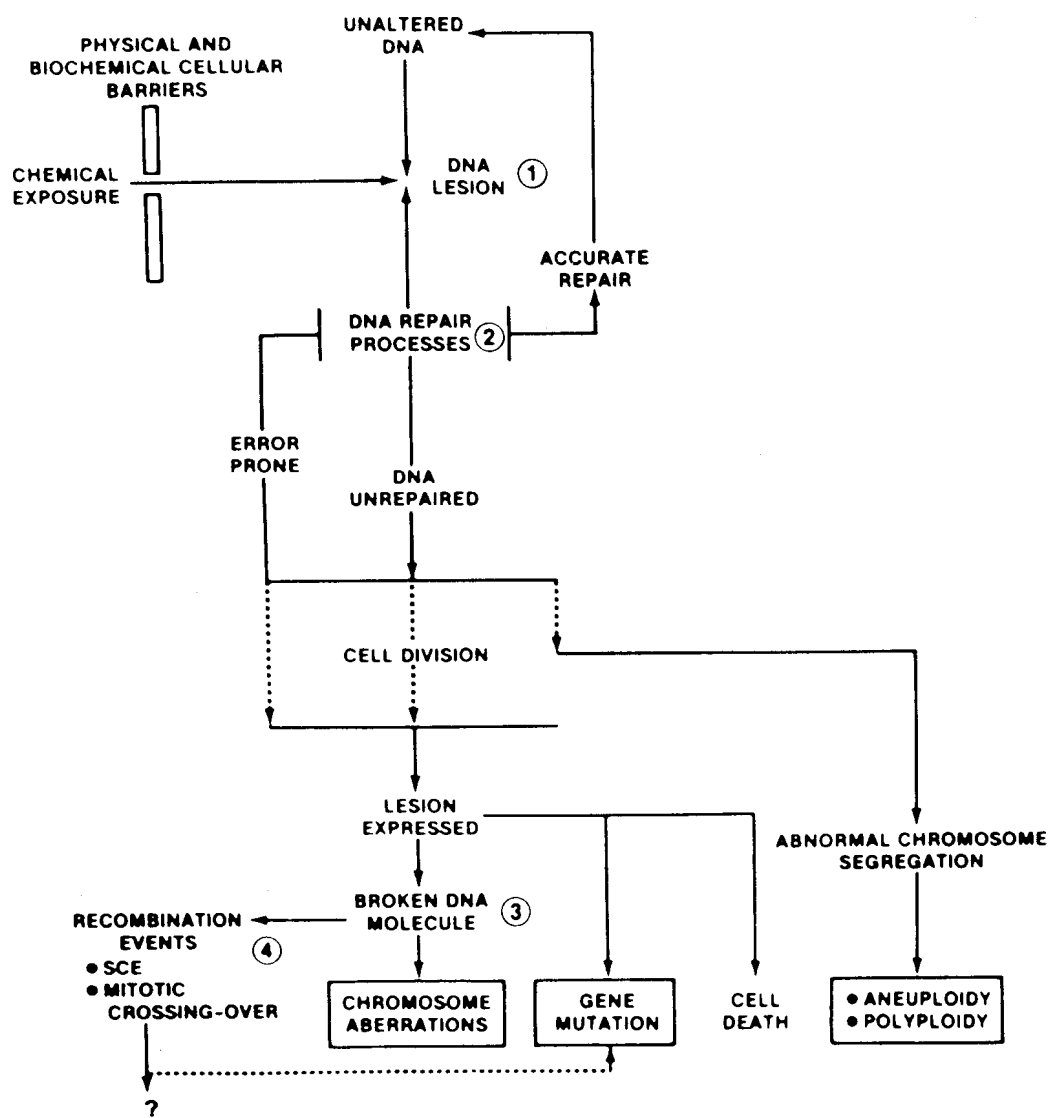
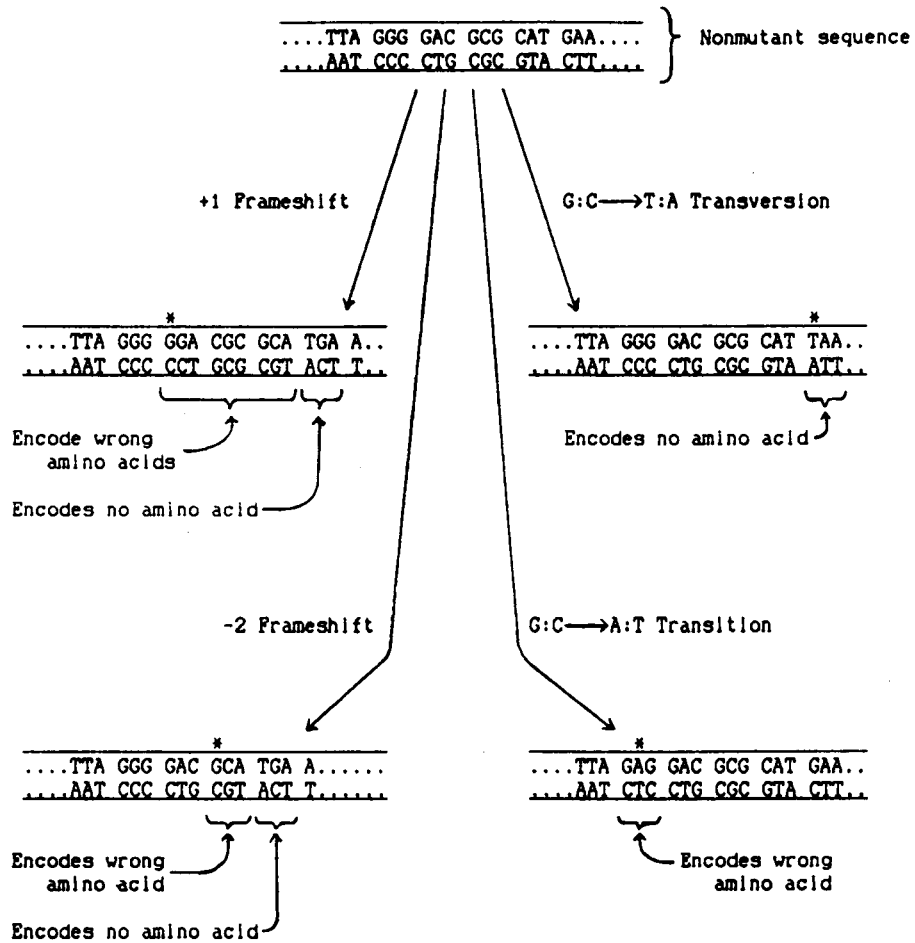


그림 7: Frameshift mutations and base-pair substitutions.



II 12: Mutagenicity Testing Batteries by 3 Basic Categories of Genetic Endpoints (Gene Mutation, Chromosomal Abberation, primary DNA Damage)

1. A Test for Detecting Gene Mutations
 - a: Bacterial Back Mutation (Ames test, Rec assay, E.coli test)
 - b: Eukaryotic Microorganisms Mutation (Yeast, Fungi)
 - c: Drosophila Sex linked Recessive Lethal (SLRL) Test
 - d: Mammalian Somatic Cells in vitro (Lymphoma)
 - e: Mouse Specific Locus test
2. A Test for Detecting Chromosomal Abberations
 - a: Cytogenetic Tests in Mammals in vivo and in vitro
(Metaphase analysis using CHO or CHL cell, Micronucleus test)
 - b: Insect test for Heritable Chromosomal Effects
 - c: Dominant Lethal Test in Rodents
 - d: Heritable Translocation Test in Rodents
3. A Test for Detecting Primary DNA Damage
 - a: DNA Repair in Bacteria
 - b: Unscheduled DNA Synthesis (UDS) in Mammalian Somatic Cells in vitro
 - c: Sister Chromatid Exchange (SCE) in Mammalian Somatic Cells in vitro

13: Minimal mutagenicity testing requirements in countries

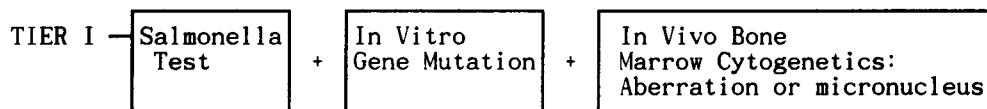
Countries	Chemical category	Required testing	Regulating agency
U.S.A	Pesticides	Three tests minimum Gene mutation Chromosome aberration DNA repair	EPA
	Medical devices (implantable polymers)	Unofficial requirements Ames test Mammalian gene mutation in vitro cytogenetics Cell transformation	FDA
European community (EEC/OECD)	All industrial chemicals in commerce > 1 but < 10 tons of production per year	Two tests minimum Ames test in vitro cytogenetics	EEC 6th Amend
	All industrial chemicals with > 10 tons of production per year	Two tests above plus in vivo cytogenetics and mammalian cell test for gene mutation	EEC 6th Amend
	All pharmaceuticals	Same as chemicals over 10-ton production	
Japan MITI	All chemicals in commerce not biodegradable	Two tests minimum Ames test (special version) in vitro cytogenetics	MOHW, MAFF,
Canada	Depends on expo- sure levels (levels of concern, LOC)	Two tests minimum (LOCI) Ames test in vitro cytogenetics	MOHW
Korea	All chemicals	Three tests minimum Gene mutation Chromosome aberration DNA repair	MOE, MOL

표하였다. 그들은 Germ cell DNA 또는 Chromatin constituent와 반응하거나 생식선을 이용한 SCE, UDS, 염색체이상을 유발하는 물질, 급성, 아급성, 만성 독성시험 결과 정자의 기형 기능이상이나 수태율 감소와 같은 생식능 변화를 유발한다는 제안적 자료가 있는 물질은 생식선에 영향을 주는 물질이며 Human germ cell mutagenecity 시험에서 양성인 물질, Mammalian germ cell mutagenecity test시 양성인 물질, 차세대로 유전되지 않는 Mammalian germ cell chromosome aberration시 양성인 물질, Mammalian germ cell과 반응하고 변이원성이 양성인 물질등은 Potential human germ cell mutagen이라고 하였다.

USEPA는 이러한 유전독성평가지침에 따라 정기적으로 유전독성평가를 위한 유전독성시험지침(Mutagenecity testing guidelines)를 심사개정하고 있다 (Dearfield 1991). 우선 농약유독물질국, 농약계획(Office of Pesticide Program, OPP)는 기존 Guideline에 의거 기존 화학물질은 물론 신규화학물질 신고자에게 요구되는 시험이 광범위하여 제출자에게 불만요인으로 작용하므로 등록시 제출되는 화학물질의 한정된 변이원성시험 Set를 제공하여 규제에 필요한 시험 요구사항을 최소한으로 줄이고 시험을 더욱 요구할 것인지 아닌지 결정할 자료를 축적하기 위하여 1991년 2월 농약의 변이원성 및 발암성예측을 위한 시험항목을 그림 8과 같이 개정하였다(Dearfield 1989, 1991). Salmonella/mammalian microsomal assay는 변이원성물질이 Frameshift형인가 Base pair substitution형인가를 쉽게 알 수 있으며 시험균주가 잘 알려져 있으며(유전학적 특징), 시험이 용이하며 전세계적으로 애용되고 있어 시험자료가 풍부하며 유효성 검정이 용이하기 때문에 선택되었다(Maron et al 1983, Arlett et al 1988, Ashby 1986, Auletta et al 1988, Kier et al 1986). 그러나 Mutagenic risk Assessment시 Prokaryote보다 Eukaryote를, Submammalian cell보다 Mammalian cell을 이용한 Gene mutation을 측정하는 것이 더욱 유효하고 Ames test보다 L5178Y mouse lymphoma cell을 이용한 Chromosome aberration이나 SCE측정이 더욱 민감하기 때문에 gene mutation을 예측하기

위해 Ames test와 Mammalian cell culture assay를 동시에 보기로 하였다(Appelgate 1990, Arlett et al 1988, Auletta et al 1988, Fox 1988, Moore et al 1989, Tennant et al 1987, USEPA 1986b). 또한 Risk assessment시 In vitro 자료보다 In vivo에서의 대사, DNA repair능, 약물동력학요인(흡수, 분포, 배설, 반감기), 표적 장기특성을 종합적 나타내는 In vivo 자료를 중시하기 때문에 Chromosome에 대한 영향을 보기 위한 시험으로서 Mouse bone marrow에서의 Chromosome aberration과 Micronucleus를 측정하는 In vivo cytogenetic assay를 선택하였다(Legator et al 1988, Mavounin et al 1990).

농약유독물질국, 유독물질과(Office of Toxic Substance, OTS)도 1991년 2월 변이원성 및 발암성예측을 위한 시험항목을 개정하였다(Cimino et al 1990, Dearfield 1991). OTS는 TSCA 4조에 의거 화학물질이 Heritable Germ cell mutagen인가 Carcinogen인가 확인하기 위해 변이원성시험 요구하는데 Heritable germ cell mutagen의 확인을 위해서 1979년 이래 Gene mutation과 Chromosome aberration에 대한 시험을 별도로 요구할 수 있는 Test scheme을 그림 9와 그림 10과 같이 규정하였었으며(Dearfield 1991) 현재 한국에 있어서 유관 연구자들 대부분이 이러한 구식의 시험지침에 얽매어 있다는 것도 부인할 수 없다(오세민 1992). 이 Test scheme은 3단계(3 Tier)로 구성되었다.



- * In vitro gene mutation(CHOICE)
 - (a) Mouse lymphoma L5178Y cells, tk locus, small and large colonies
 - (b) Chinese hamster ovary(CHO) cells strain AS52
 - (c) CHO or Chinese hamster lung(CHL) fibroblasts(V79) cells plus appropriate in vitro test for clastogenicity

그림 8: Current OPP mutagenicity TEST SCHEME

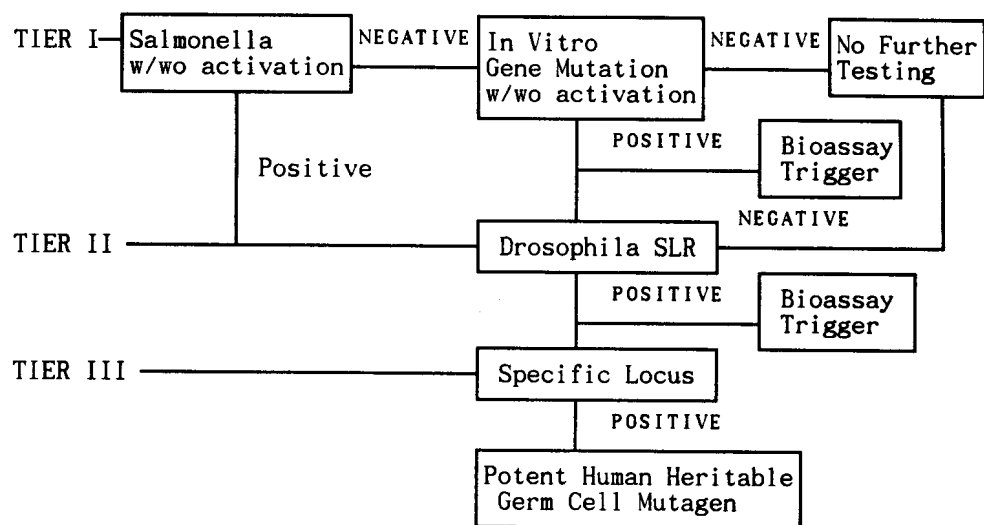


그림 9: Former OTS Gene mutation TEST SCHEME

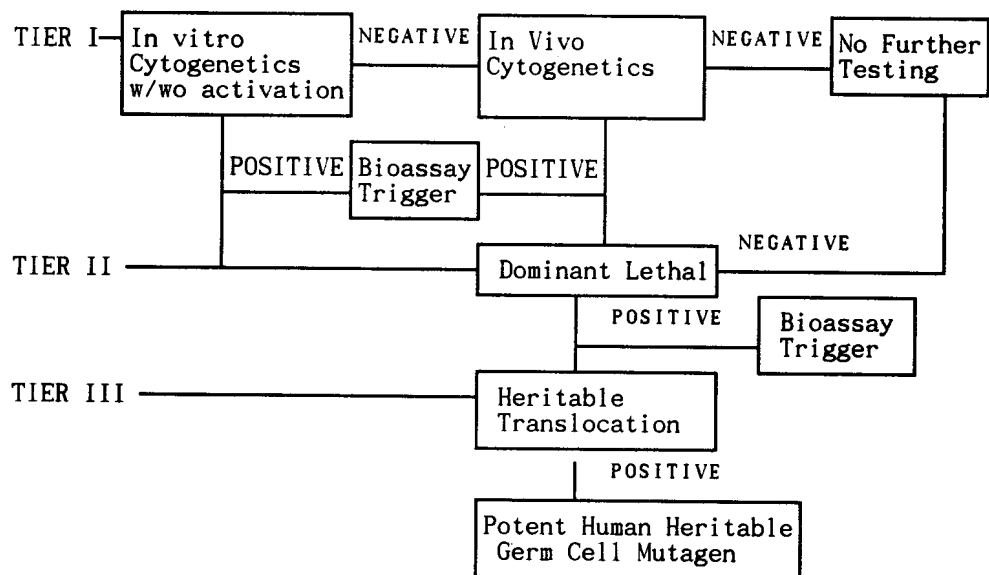


그림 10: Former OTS Chromosome aberration TEST SCHEME

Gene mutation scheme(그림 9)에서 첫 단계에서는 Salmonella test를 요구하였으며 음성일 경우 Mammalian cell culture를 이용한 In vitro gene mutation assay를 요구하였다. 이 두 시험이 모두 음성이면 더 이상 시험을 요구하지 않았으며 하나라도 양성이면 2단계로 Drosophila sex linked recessive lethal assay(SLRL)를 요구하였으며 양성일 경우 제3단계로 Visible specific locus test를 요구하였었다. Chromosome effect scheme(그림 13)에서는 1단계로 In vitro cytogenetic assay를 요구하였고 음성일 경우 In vivo cytogenetic assay를 요구하였으며 이 중 한개라도 양성일 경우 2단계로 Rodent dominant lethal test를 요구하였으며 모두 음성일 경우 더 이상 시험을 요구하지 않았고 양성일 경우 Rodent heritable translocation assay를 요구하였다. 이들 두 Test scheme에서 첫단계에 속하는 4종류의 시험은 Intrinsic mutagenic potential을 Screening하기 위한 것이고 두번째 단계에 속하는 2개의 시험은 화학물질의 생체 생식선에의 도달능과 Germ cell DNA와의 상호작용 여부를 보기위한 것이며 3단계에 속하는 시험 2개중 하나라도 양성이면 Mutagenecity risk assessment Guideline에서 제시한 바처럼 Potent human heritable mutagen으로 분류되었으나 1991년 2월 이후 개정되었다. 이들 Scheme이 서로 독립적으로 요구되었던 이유는 화학물질에 따라 Gene mutagen이거나 Chromosome abberation 유발물질이었기 때문이며 반드시 Defined Genetic endpoint를 측정할 수 있는 시험만 선택되어 SCE나 UDS는 제외되었었다. 또한 OTS는 1982년 이래 TSCA 4조에 의거 Potential carcinogenicity 예측시험으로서 위의 변이원성 Test scheme을 이용하여 왔다. Salmonella test와 Drosophila SLRL 시험 모두 양성일 경우, In vitro gene mutation 시험이 양성일 경우, In vitro 또는 In vivo chromosome abberation assay가 양성일 경우 2년 발암성시험(2-Year Carcinogenicity test)을 요구하였었으나 1991년 이후 개정되었다.

TSCA 5조에 의거 신규화학물질 심사에 있어서 변이원성시험은 Exposure based testing, Heritable genetic effect, Potential carcinogen을 예측하기

위해 사용되나 TSCA 5조a항은 제출자에게 변이원성시험을 요구할 수 없다. 따라서 OTS는 제출된 각종 독성자료와 구조활성관계에 의거하여 평가하나 1989년 이후 생산량이 100,000 kg이상인 PMN 물질인 경우만 Ames test와 소핵 시험 자료를 요구한다. 그러나 구조활성관계로 보아 규제 필요성이 있으면 5조e항에 의거 Ames test와 소핵시험을 요구하여 양성일 경우 2년 발암성시험을 요구한다. 그러나 제출자에게 이것이 De Facto Ban(Actual Ban)으로 작용하여 PMN을 철회하게 경향이 있다.

그러나 Willamburg meeting등 Mutagenecity testing의 역할등에 관한 각종 회의(Arni etal 1988, Ashby 1986, Auletta etal 1988, Ennever etal 1988, Kier 1988, Lave etal 1986, Legator etal 1988, Tennant etal 1987)와 USEPA의 유전독성평가지침(USEPA 1986b)등 과학적 자료에 근거하여 Heritable mutation과 Potential human carcinogen의 예측할 수 있는 시험지침인 기존 Test scheme을 1991년 이후 그림 11과 같이 개정하였다 (Dearfield etal

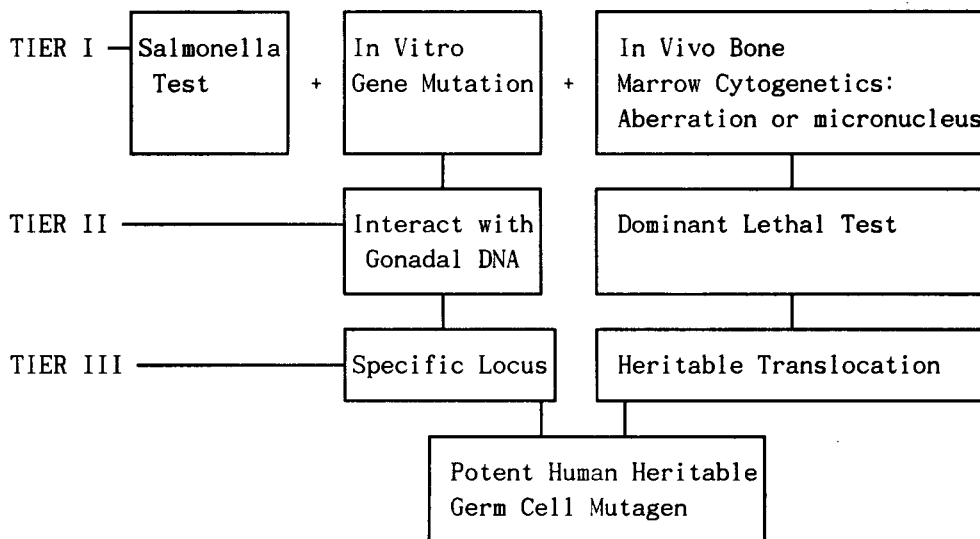


그림 11: Current OTS mutagenicity TEST SCHEME

1991). 첫 단계에서 Gene mutation과 Chromosome aberration를 동시에 실시할 것을 요구하고 2단계에서는 Drosophila SLRL 대신 정자세포를 이용한 UDS, SCE, Chromosome aberration 시험과 Dominant lethal test를 요구하며 양성일 경우 3단계시험을 요구하여 양성일 경우 Potential human germ cell mutagen인가 결정한다. 2년 발암성시험을 요구하는 경우는 첫 단계에 속하는 시험 3개 모두 양성일 경우인 또는 Ames test또는 In vitro gene mutation test와 In vivo chromosome aberration test 2개 동시 양성일 경우로 제한하고 있다. 즉 In vivo chromosome aberration test가 반드시 양성이고 Gene mutation test가 양성일 경우 2년 발암성시험을 요구한다. 3개 시험중 하나만 양성이거나 In vitro 시험 2개가 양성일 경우는 제출된 자료(각종 독성자료, 구조활성관계, 생산량, 노출평가 등)를 상세히 심사(Data peer review)한 후 시험요구 여부를 결정한다.

1-4. 이소시아네이트 화합물

Diisocyanate는 Polyurethane 제조에 사용되는데 활성화수소화합물의 종류, 성형법에 따라 물성이 대단히 다른 제품이 만들어지며 침구매트리스, 자동차용부품, 가구의자, 냉동냉장단연재, 구두창, 합성피혁, 인공목재, 토질안정제, 도금 등 광범위한 분야에 이용되고 있다(USITC 1985). 이중 가장 문제시 되고 있는 물질은 직업성천식 유발물질로 규제되고 있는 Toluene diisocyanate(TDI, CAS No: 584-84-9, 26471-62-5), Diphenylmethane diisocyanate(MDI, CAS No: 9016-87-9), Hexamethylene Diisocyanate(HDI, CAS No: 822-06-0), Isophorone diisocyanate(IPDI, CAS No: 4098-71-9)이며 1988년 한국에서는 각각 17744톤, 464톤, 30톤, 39.5톤이 사용유통되었다(환경처 1990). 이외에도 Naphthalene diisocyanate(NDI, CAS No:), Methylene bis(4-cyclohexylisocyanate)(MBCI, CAS No: 5124-30-1)도 있으며 이상 6개의 화합물은 독성이 유사한 것으로 보고되고 있다(IRPTC 1989, OSHA 1989). TDI

는 99.5% 2,4-TDI나 2,4-TDI와 2,6-TDI의 80:20, 65:35 혼합물로 사용되고 있다.

TDI는 분자량 174.17로서 실온에서 무색-엷은 황색 액체이고 0.7mg/m³에서 자극성 악취가 난다. 4.7 C - 22 C 에서 얼며 25 C에서 끓는다(Pollock etal 1974). 물과 반응하여 물량에 따라 Polyurea, CO₂, 변이원성이 보고된 소량의 Toluene diamine(TDA)이 형성된다[RN=C=O + H₂O -- RNHCOOH -- RNH₂ + CO₂](Chadwick etal 1981, IPCS 1987a, 1987b).

TDI들은 환경에 폐기되면 급격히 가수분해되어 (분해반감기는 pH와 물탁도에 따라 반감기 0.5초-3일) 불활성 Polymeric Urea를 형성하거나 광분해되거나 Hydroxyl Radical에 의해 산화된다(Brochhagen etal 1983, Hardy etal 1978). TDI는 수생생물에 대해 10.5-508mg/L 농도에서 치사시키며 양서류에 대한 LD50은 100mg/kg이다(IPCS 1987a).

TDI의 혈중 반감기는 30초이하이며 20분내에 위장으로부터 없어지나 고용량의 경구 투여시 불용성 Polyurea coated globules을 형성하여 장기간 체류하며 경구투여시 주 대사체인 mono-, di-acetylated diaminotoluene이 배설된다(Slatte 1991). 작업장에서의 TDI 기중농도및 혈액과 뇨중농도를 분석하는 방법은 HPLC, GC등이 보고되어 있으나(Audunsson etal 1983, Holdren etal 1984, Skarping etal 1991, Warwick etal 1981) 이들 물질의 Biological Exposure indices는 아직 설정되어 있지 않다.

TDI는 생체내에서 반응성이 매우 크므로 Free Form으로 생체내 흡수 또는 분포되기보다는 접촉하는 조직과 반응한다(IPCS 1987, NTP 1985, Slatte 1991). . 그들은 단백질을 포함한 염기성물질과 반응하는데 주로 조직의 hydroxyl, amino, carboxyl, sulphohydryl group과 반응하며 Covalent binding하여 단백질을 불활성화하는데(Brown etal 1987) 직업성 천식을 유발하는 것은 TDI가 단백 또는 다당체와 반응하여 Hapten을 형성하여 생체가 IgE를 다량 형성하기 때문인 것으로 알려졌다(Baur etal 1981, 1983, Cartier etal 1989).

TDI는 4시간 흡입급성치사량(LC50/4H)이 70-350/m³으로 강력한 급성흡입독성 물질로 알려져있으며 폐부종과 폐출혈로 사망한다. 급성경구치사량은 3.06-4.13g/kg이며 급성경피치사량은 10g/kg으로서 간장, 신장, 위장관, 피부 장애가 유발된다(IPCS 1987, IRPTC 1989). TDI는 동물의 호흡기, 안구, 피부 점막을 자극하며 호흡기 및 피부의 접촉성 알러지 유발물질(contact sensitizer)이다(Alarie 1973, Belin et al 1983,). TDI에 한번 감작된 후 다시 노출되면 급성과민반응을 일으키는데 이러한 급성과민반응은 면역독성학적으로 심도있게 분석 연구되고 있다(Berman et al 1992, Bernstein 1982, Cvitanovic et al 1989, Finotto et al 1991, Karol et al 1991, TAP 1992). 폴리우레탄 제조공장이나 스프레이 취급자에서의 TDI 노출은 동물에서와 마찬가지로 호흡기, 피부, 안구, 위장관에 독성을 유발한다(Adams 1975). 0.014ug/m³ 이상의 TDI에 노출된 근로자들은 기도자극, 천식성 과민반응, 폐기능 저하등 호흡기질환에 걸린다.

TDI의 변이원성에 대해서는 논란의 여지가 있다. 미생물을 이용한 Gene mutation 시험의 일종인 Ames test를 이용한 변이원성시험에서 Purchase 등(1978) 및 Anderson등(1978)은 음성이라고 하였으나 Anderson등(1980)은 2.4TDI와 2.6TDI 혼합물(80:20)은 TA98, TA100, 1535균주에 대해서 Phenobarbital 유도 S9 존재하 용량 의존적으로 변이원성을 유발하였으며 NTP(1986) 및 김등(1988)도 Aroclor 유도 S9 존재하 TA98, TA100 균주에 대해서 변이원성을 유발한다고 보고하였다. 또한 Ong T등(1987)은 폴리우레탄 제조공장에서 채취한 시료의 변이원성을 검색한 결과 양성임을 확인하고 이는 TDI에 의한다고 결론지어 TDI가 약한 변이원물질임을 제안하고 있다. 인간 및 Hamster cell line등 포유류 배양세포를 이용한 Gene mutation 시험의 일종인 Cell transformation assay를 이용한 변이원성시험에서 Purchase등(1978) 및 Styles등(1978)은 TDI는 아무런 영향을 보이지 않았다고 보고하였다. 인간의 말초 혈액 림파구등 포유류 배양세포를 이용한 Chromosome aberration시험의 일종인 In vitro cytogenetic assay를 이용한 변이원성시험에서

Maak-Paakkana등(1987)은 S9에 관계없이 TDI는 0.019 ul/ml까지, MDI는 0.54 ul/ml까지 염색체이상과 SCE를 용량의존성없이 유발하였다고 하였으나 In vivo Chromosome aberration시험의 일종인 Bone Marrow세포를 이용한 Micronucleus 시험에서 Loeser(1983)는 TDI 80:20 혼합물 0.35와 1.06ug/m³을 CD rat와 CD-1 mice에 하루 6시간 주 5일 4주간 흡입시킨 rat와 mice의 골수 중 소핵발현이 발견되지 않았다고하였다.

TDI의 발암성은 노출경로에 따라 다른 결과를 보였다. NTP(1986)에서는 80:20 혼합물을 Fisher 344/N Fendle rat와 BCF mice에 60 과 120mg/kg, 음성 rat와 mice에 120과 240 mg/kg을 주 5일, 2년간 경구투여하였을때 체중감소와 아울러 70-103주에 8- 88%가 사망하며 양성 및 악성피부암, 췌장암이, 자성 rat에서 양성 및 악성피부암, 췌장암, 간암, 유방암이, 자성 mice에서는 Haemangioma, 간암발생이 증가하였으나 음성 mice에서는 유의적인 변화가 없었다고 보고하였다. 그러나 Loeser(1983)는 TDI 80:20 혼합물 0.35와 1.06ug/m³을 CD rat와 CD-1 mice에 하루 6시간 주 5일 104-110주간 흡입시켰을 때 발암성을 발견할 수 없었다고 보고하였다.

이상의 TDI독성자료를 평가한 유해성에 근거하여 IPCS(1987), IARC, NIOSH, United Auto Workers등(OSHA 1989)은 TDI가 매우 강한 흡입독성 물질이며 Potential human carcinogen과 Animal carcinogen으로 지정할 것을 제안하고 흡입에 의한 발암성시험이 재차 수행되어야하며 이들 물질 취급근로자들의 신경행동독성, 최기형성에 관한 기초자료를 마련하여야한다고 권고하고 있다(IRPTC 1989, OSHA 1989). 미국의 NIOSH는 이들 6개의 화학물질에 대하여(NIOSH 1978, OSHA1989), ACGIH는 NDI를 제외한 5개의 화학물질에 대하여(ACGIH 1991) 8H-TWA, STEL을 각각 0.005ppm, 0.02ppm를 제시하고 있으며 IPDI만이 경피흡수가 강한 물질로 제시하고 있다(ACGIH 1991, OSHA 1989). 그러나 OSHA는 1989년 1월 TDI IPDI, MBCI등 3개만의 Diisocyanate화합물의 작업장 허용농도를 개정하여 TDI, IPDI의 8H-TWA, STEL을 각각 0.005ppm, 0.02ppm으로 하고 MPCl에 대해서는 STEL 0.01ppm만을 지정하여 노동자의 건강

보호를 위한 허용농도인가하는 논란을 불러일으켰다(목명수 1992, OSHA 1989, Robinson et al 1991). 그리고 ATSDR 및 USEPA는 1987년부터 화학물질의 독성 강도에 따라 우선순위표(National Priority List, NPL)를 발표하고 있는데 1991년 현재 275개의 화학물질을 발표하였으며(ATSDR/EPA 1987a, 1987b, 1988, 1989, 1990, 1991a, 1991b) TDI는 175번째로 순위를 주어 Toxicological profiles for toluene diisocyanate를 작성하고 있다(ATSDR 1991a, 1991b). 한편 한국의 노동부는 1988년 산업안전보건법에 의거 대기업의 자문관들로 구성되어 기업의 압력을 받으며 대다수 미발표되어 공정성이 결여된 기업비밀정보(Confidential Business Information)에 근거하였기 때문에 오히려 노동자의 건강보호 측면이나 사회경제적, 기술적 측면에서 보다 불합리하고 불공정한 허용로출기준을 제시한 사적 집단(Castleman et al 1988)인 미국정부산업체위생전문가회의(ACGIH)가 채택한 Diisocyanate류의 TLV(ACGIH 1991)를 준용하여 유해물질의 허용농도를 고시하고 1989년 3월 1일부터 시행하고 있는데 과연 Diisocyanate에 의한 한국 노동자의 직업병 예방을 위한 허용농도로서 적절한 것인가 그리고 허용농도를 설정할 보다 합리적인 제도가 마련될 필요성은 없는가라는 의문이 제기된다(노동부 1988).

1-5. 연구동기

노동부는 산업안전보건법에 의거 신규 및 기존화학물질의 유해성 심사를 실시하고 있다. 신규화학물질을 신고하려는 자는 유해성심사에 필요한 화학물질의 독성등에 관한 자료를 제출해야 하는데 92년 개정된 산안법 시행세칙 제 83조 규정에 의하면 신규화학물질의 유해성조사에 필요한 시험은 “미생물을 이용한 복귀돌연변이 시험과 포유류 배양세포를 이용한 염색체 이상시험 또는 이와 동등이상의 결과를 얻을 수 있는 시험이나 발암성시험”이라 하고 있으며 노동부고시 92-25호 신규화학물질 유해성조사 및 심사기준안 제3절 31조에 의하면 미생물을 이용한 복귀돌연변이시험 및 포유류 배양세포를 이용한 염색체

이상시험과 이외 동등이상의 결과를 얻을 수 있는 시험“은 소핵시험, 우성치사시험등 포유동물 개체의 생식세포를 이용하는 변이원성시험 등으로 한다고 규정하고 있다. 현재 법적으로 국립환경연구원, 국립보건안전연구원, 화학연구소, 산업보건연구원등 연구소를 독성자료 인정기관으로 하고 있으나 설립된 지 1년도 안된 산업보건연구원은 이러한 연구를 수행할 역량을 키워가지 않으면 안되는 상황이다.

따라서 본 연구는 산업안전보건법에 의거 신규 화학물질의 변이원성시험을 요구할 경우에 대비하고 아울러 생물학적 독성모니터링의 일환으로서 근로자에 있어서 유전독성 검색을 수행할 목적으로 우선적으로 유전독성뿐만 아니라 발암성 예측시험에 1차적으로 요구되는 Ames 시험 방법을 정립하고자 하며 또한 천식성 물질로 잘 알려져 있으나 변이원성에 대해서 논란이 있는 TDI, MDI 등 이소시아네이트 화합물의 변이원성을 비교하고자 하였다.

2. 시험 방법

2-1. 시험물질 및 시약, 기구

시험에 사용한 시약으로는 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, Citric acid $1H_2O$, K_2HPO_4 , $NaH_2PO_4 \cdot 4H_2O$, DDW, Glucose, Agar, NaCl, Biotin, L-histidine.HCl, Aroclor 1254, NADP, Glucose-6-phosphate, Difco nutrient broth, DMSO, 2-Aminoanthracene(2-AA), 2-Nitrofluorene (2-NF), Sodium Azide, 9-Aminoacridine.HCl(9-ACR), Crystal violet, Ampicillin, TDI, MDI로 Sigma 또는 Aldrich 특급시약이었으며 시험에 사용한 기구는 Clean Bench, Flask, Hot Plate, Petri dish sterilized with Ethylene oxide gas(90mm), 37 C dry incubator, 500ml Beaker, Eppendorf repeating pipette, Eppendorf 8 channel pipette, 100 ml Culture bottle, 0.45 um milipore filter(water), 0.45 um milipore filter(water), Surgery Box, 100mm beaker, Electronic homogenizer, 500 ml culture bottle, Kontron T-124 Ultracentrifuge (rotor A8.24 $r=10.8cm$), Cryotube(1.8 ml, Nunc), -80 C Refrigerator, 50 ml conical culture tube(Nunc), 300 ml Erlenmeyer Flask, Autoclave, 37 C Gerorotory incubator, Test tube(11x100mm), Filter disc (6mm in diameter, 시판되는 펀치로 제작), Dial Caliber(Mytsutoyo)이었으며 S9을 제조하기 위하여 SD male rat(6-8 wk, 180-200 g)을 서울대학교 동물사육장에서 구입하였다. TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537등 시험 균주들은 국립보건안전연구원(National Institute for Safety Research)에서 구입하였다.

2-2. 최소글루코스한천평판배지(Minimum Glucose Agar Plate, MGAP)의 제작

2-2-1. Vogel-Bonner(VB) media (10x)의 조제

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g, Citric acid $1H_2O$ 10 g, K_2HPO_4 50 g, $NaH_2PO_4 \cdot 4H_2O$

17.5 g과 DDW 500 ml를 1 Liter Flask에 넣고 고압멸균하여 냉장보관하였다. $MgSO_4$ 는 물에 난용이나 멸균과정에서 완전히 용해된다. $NaH_2NH_4PO_4 \cdot 7H_2O$ 는 순도가 낮기 때문에 TA1537의 양성대조물질인 α -aminobenzidine의 Spontaneous revertants수를 증가시키는 것으로 보고되었기 때문에 대신 3.3 g NaOH 와 9.6 g $H_2NH_4PO_4$ 가 권장되고 있다. 원액의 pH는 7.0이다.

2-2-2. VB media (1x)의 조제

VB media(10x) 100ml와 2차증류수(DDW) 100ml를 500ml flask에 넣고 고압멸균한후 Clean Bench 안에서 Hot Plate를 이용 60 C로 보존하였다.

2-3-3. 20% glucose 용액

20 g의 glucose와 100 ml의 DDW를 250 ml flask에 넣고 용해한 다음 고압멸균한 후 Clean Bench 안에서 Hot Plate를 이용 60 C로 보존하였다.

2-2-4. Agar 용액

15 g의 agar와 700 ml의 DDW를 2 liter flask에 넣고 용해한 다음 고압멸균한 후 Clean Bench 안에서 Hot Plate를 이용 60 C로 보존하였다.

2-2-5. MGAP의 조제

Clean Bench 안에서 2, 3, 4 용액을 2 Liter Flask에 넣어 섞고 Hot Plate를 이용 60 C로 보존한 후 30 ml씩 Ethylene oxide gas로 멸균한 Petri dish에 분주하고 수평으로 방치하여 냉각응고시킨 다음 상하를 전도시켜 실온에서 2일간 방치하거나 37 C 배양기에 넣어(절대 냉장보관하지 말 것) 여분의 수분을 증발시킨후 사용하였다.

용액을 분리하여 고압멸균하는 이유는 당과 한천이 암모늄염과 혼합하여 고압멸균 시 착색하여 변이원성물질을 생성하기 때문이며 절대 냉장보관하지 말 것. 여분의 수분을 증발시키는 이유는 수분이 남아 있으면 Top agar가 부착되

지 않고 분리되기 때문이다. Ethylene oxide gas로 멸균한 Petri dish는 최소한 6개월이 경과한 것을 사용해야하는데 이는 Ethylene oxide가 Base pair substitution형 변이원성 물질이므로 TA 92, TA100, TA1535 및 E.coli WP2uvrA등에 변이원성을 표시하여 대조군의 Spontaneous revertants 수가 증가하기 때문이다.

2-3. Top agar의 조제

2-3-1. Soft agar의 조제

500ml Beaker에 Agar 2.4 g, NaCl 2.0 g과 DDW 400ml를 넣고 고압멸균한 다음 Clean Bench 안에서 Hot Plate를 이용 60 C로 보존하였다.

2-3-2. 0.5 mM Biotin

12.35 mg D-biotin 및 100ml DDW를 100 ml Culture bottle에 넣고 가열 용해한 다음 0.45 um 여과멸균한 다음 냉장보관하여 1달간 사용하였다.

2-3-3. 0.5 mM Biotin/5.0 mM Histidine의 조제

960 mg L-histidine.HCl과 12.35 mg D-biotin 및 100ml DDW를 100 ml Culture bottle에 넣고 용해한 후 0.45 um 여과멸균한 다음 냉장보관하여 1달간 사용하였다.

2-3-4. 0.5 mM Biotin/0.5mM Histidine의 조제

96 mg L-histidine.HCl과 12.35 mg D-biotin 및 100ml DDW를 100 ml Culture bottle에 넣고 용해한 후 0.45 um 여과멸균한 다음 냉장보관하여 1달간 사용하였다.

2-3-5. 5.0 mM L-Tryptophan의 조제

102 mg L-Tryptopham 및 100ml DDW를 100 ml Culture bottle에 넣고
용해한 다음 0.45 um 여과멸균한 다음 냉장보관하여 1달간 사용하였다.

2-3-6. 0.5 mM L-Tryptophan의 조제

10.2 mg L-Tryptopham 및 100ml DDW를 100 ml Culture bottle에 넣고
용해한 다음 0.45 um 여과멸균한 다음 냉장보관하여 1달간 사용하였다.

2-3-7. Top agar의 조제

Histidine 요구성 시험에서는 2-3-1 용액과 2-3-2용액을 10:1 비율로,
막변이 시험과 Ampicillin 내성시험 및 정량적 세포독성시험에서는 균주에 따
라 2-3-1 용액과 2-3-3용액 또는 2-3-5용액을 10:1 비율로, 기타 시험에서는
균주에 따라 2-3-1 용액과 2-3-4용액 또는 2-3-6용액을 10:1 비율로 각 시험
전에 Clean Bench 안에서 섞어 Hot Plate를 이용 45 C로 보존하였다.

2-4. Aroclor 1254(PCB 1254) Induced S-9(MF0, P-450s) mix(10%)의 조제

2-4-1. 동물의 전처리

SD 웅성 rat 5 마리(6-8 주령, 180-200 g)를 최소한 7 일 순화시킨 후
Aroclor 1254를 체중 Kg당 500mg을 복강주사하였다. PCB 2g을 10ml corn oil
에 넣고 완전히 용해시키기 위하여 50 C로 가온하였으며 1일간 실온에 보관한
후 사용하였다.

2-4-2. S9의 조제

복강주사후 104시간부터 절식시키고 16 시간후 머리를 쳐 기절시킨 다음
목을 잘라 실험시킨 후 70% ethanol로 복부를 흠뻑 적신 다음 Surgery Box에
서 간전체를 무균적으로 절제하였다. cold 0.15M KCl가 든 100ml beaker에서

3회 세척한 후 미리 무게를 달아둔 100mm beaker에 넣어 간중량(10-15 g/rat)을 측정하였다. 0.15 M KCl용액은 11.19 g KCl을 1 liter DDW에 용해한 후 milipore filtration하여 멸균하였다. 가위로 간을 세절하고 간중량의 3배에 해당하는 cold 0.15 M KCl을 가하여 Electronic homogenizer(screw는 고압멸균하였음)를 이용하여 간을 균질화하였다. cold 500 ml culture bottle에 모두 모아 Kontron T-124 원심분리기(rotor A8.24 r=10.8cm)를 이용하여 9000 g(8600 rpm), 0-2 C하에서 10분간 원심분리하였다. 상등액 1.5ml을 Cryotube(1.8 ml, Nunc)에 넣고 Dry Ice와 Acetone으로 급냉시킨 후 -80 C에 냉동보관하였다. 균의 오염여부를 배양하여 확인하였다. 전과정을 Scheme 1에 표시하였다.

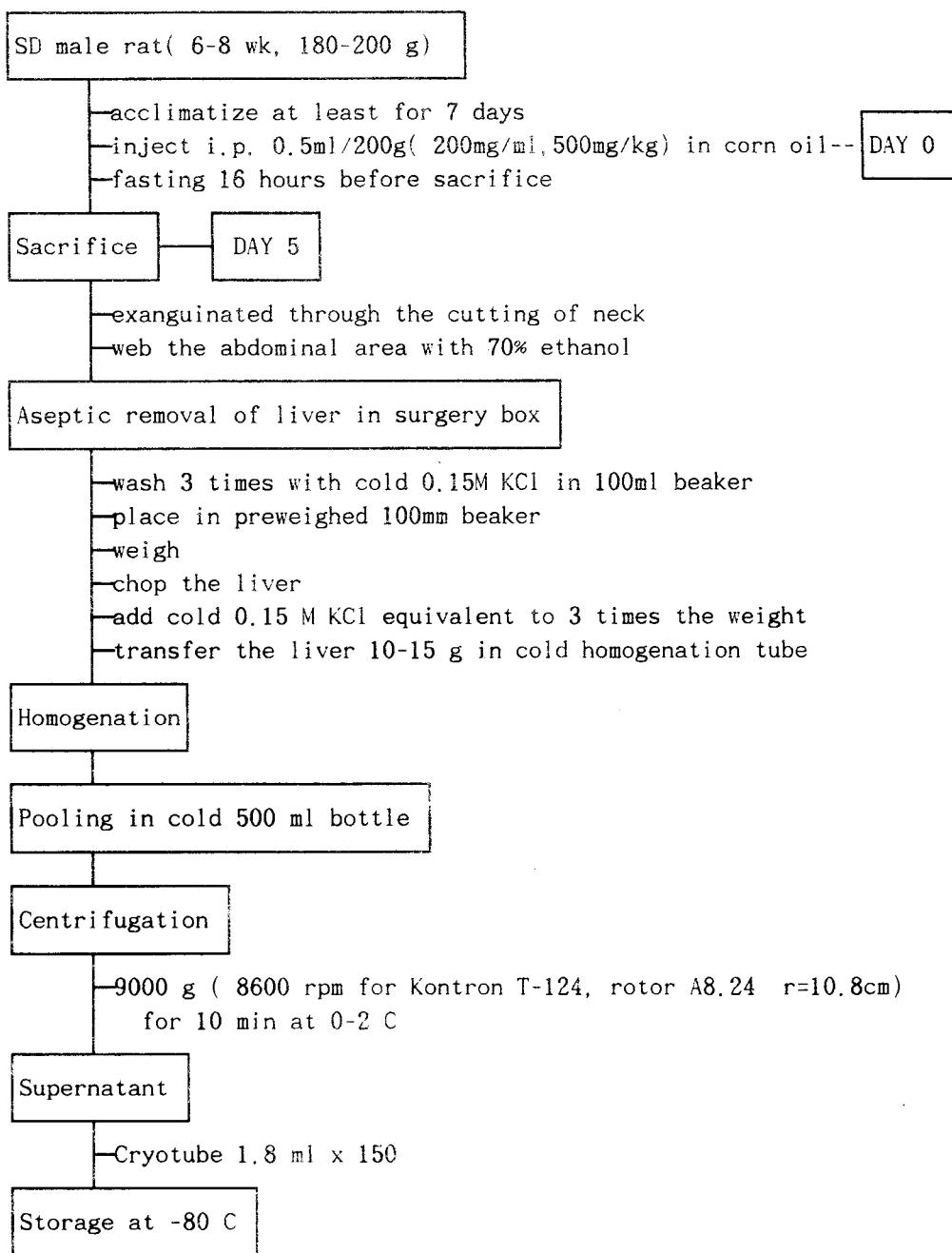
2-4-3. S9 mix(10%)의 조제

냉동보관된 S9을 1분내 녹였다. 다음 순서대로 시약을 가하여 NADP의 침전을 방지하였다. 2.5 ml 0.1 M Phosphate buffer 20.9 ml, 0.1 M NADP 1.0 ml, 1.0 M Glucose-6-phosphate 0.125 ml, MgCl₂-KCl 0.5 ml 및 S9 2.5 ml을 50 ml conical culture tube(Nunc)에 넣고 혼합하였다.

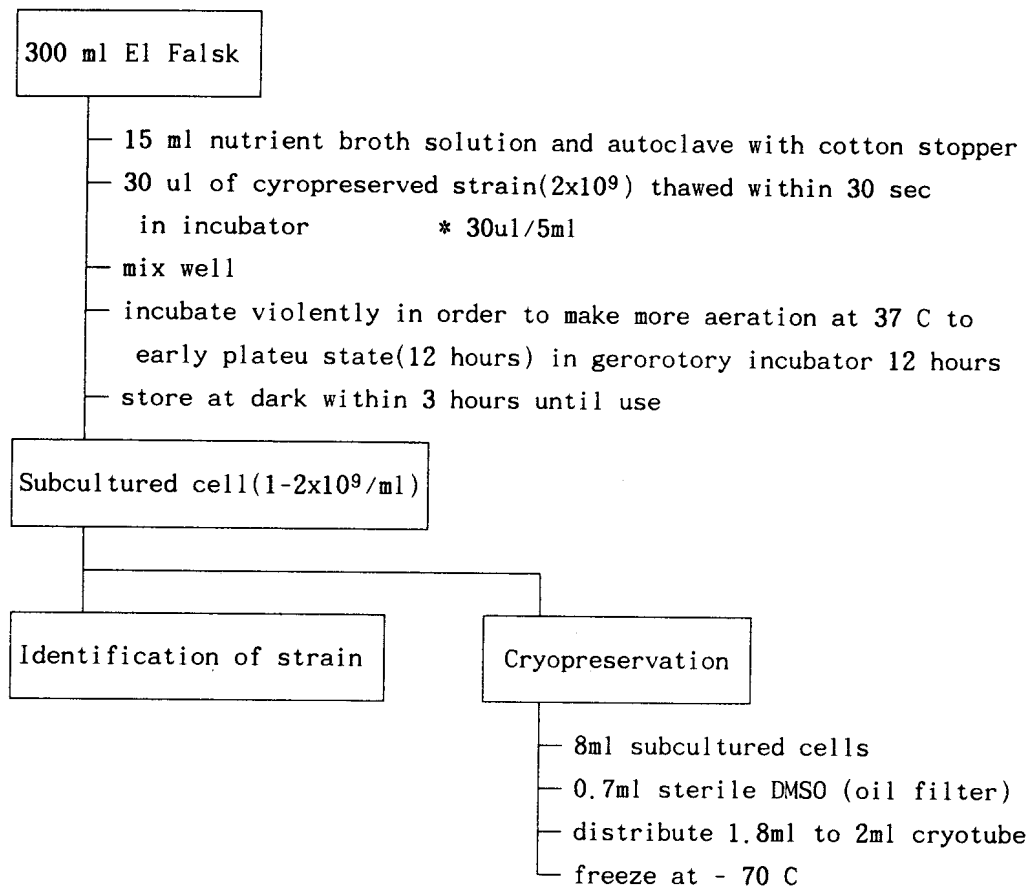
2-5. 시험균주의 전배양과 냉동보관

2-5-1. 전배양 방법

멸균된 300 ml 삼각 Flask 5개에 15 ml nutrient broth 용액을 각각 넣고 지면으로 마개를 막은 다음 고압멸균한 후 실온까지 방냉하였다. Nutrient broth 용액은 Difco nutrient broth 0.8 g, NaCl 0.5 g 및 DDW 100 ml을 300ml 삼각 Flask에 가하여 조제하였다. 냉동보관된 균주들(약 2×10^9 개/ml)을 1분내에 녹이고 15ml 당 90ul을 가하고 잘 혼합한 다음 37 C 배양기에 분당 210회 회전시키어 산소가 충분히 공급되도록 하여 12 시간 배양하였다.



Scheme 1: Preparation of Aroclor 1254(PCB 1254) Induced S-9(MFO, P-450s)



Scheme 2. Subculture of test strain and Cryopreservation of subcultured strain

배양세포($1-2 \times 10^9/\text{ml}$)는 알미늄 호일로 차광하여 냉장고에 보관하였으며 3 시간 이내에 시험에 사용하거나 다음과 같은 방법으로 다시 냉동보관하였다.

2-5-2. 냉동보관 방법

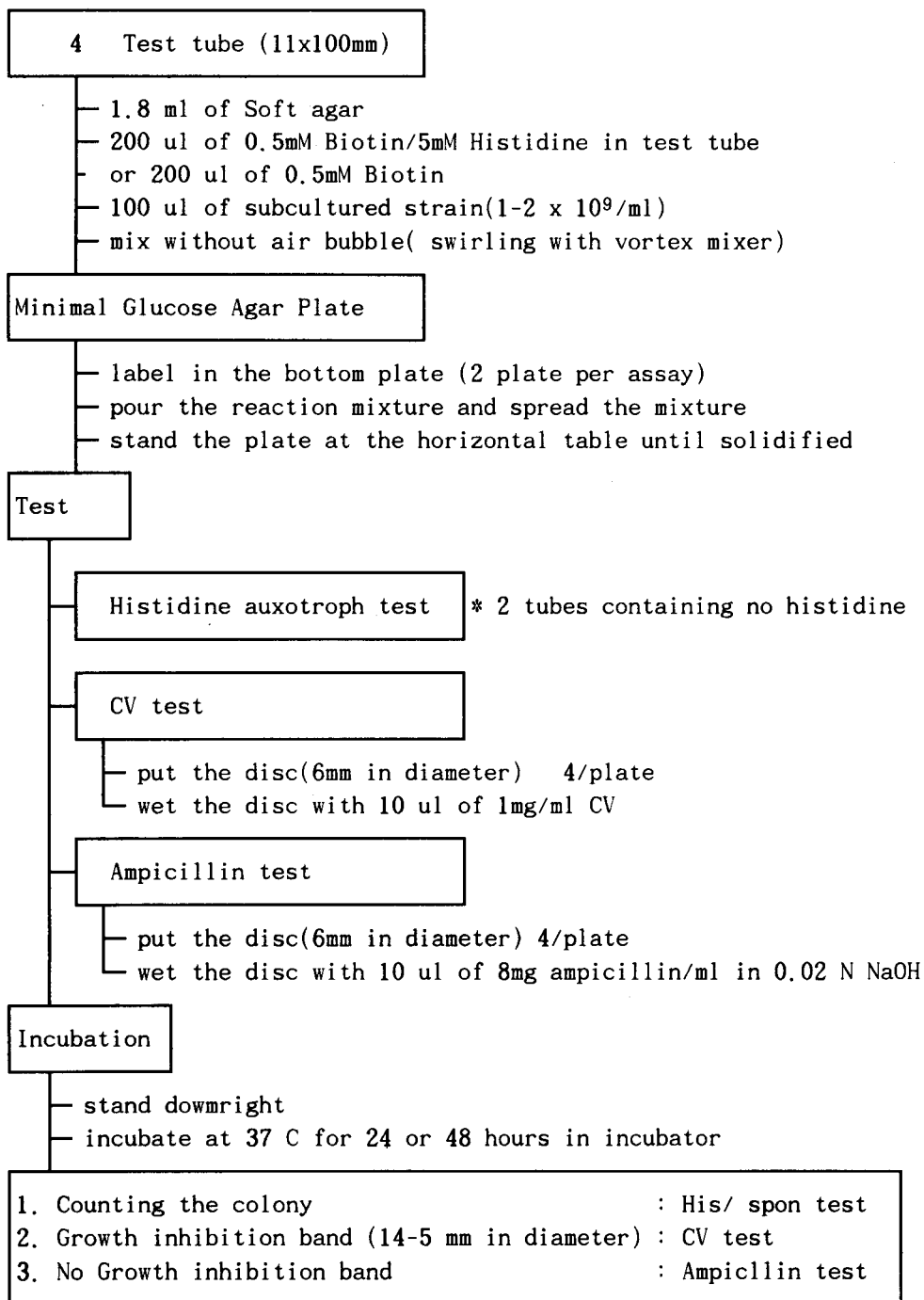
8 ml의 전배양 세포액에 0.7ml sterile DMSO(oil filter, Gelman)을 가하고 잘 혼합한 다음 1 ml cryotube에 0.8 ml 씩 분주하고 즉시 -70°C 에 냉동보관하였다. 전과정을 Scheme 2에 표시하였다.

2-6. 시험균주의 특성과 동정시험

모든 시험은 Clean Bench내에서 조작했으며 전과정을 Scheme 3에 표시하였다.

2-6-1. 시험균주의 특성

표 14는 시험에 사용하는 균주의 특성을 나타낸 것으로 TA98, TA100, TA1535, TA1537등 균주는 Salmonella 균의 Histidine 유전자에 돌연변이를 유발하여 Histidine이 없으면 사멸하는 Histidine 요구성 균주(Histidine Auxotroph strain)이다. TA100, TA1535등은 염기치환형 변이원성 물질의 검색에, TA98, TA1537등은 Frame shift 형 변이원성 물질의 검색에 사용한다. TA92, TA94는 DNA chain에 Bridge를 형성하는 변이원성 물질의 검색에 사용한다. 이들 균주는 Salmonella typhimurium LT2에서 유래한 균주로 Wild type의 성질은 그대로 보존되었으나 시료의 투과성을 높여 분자량이 큰 물질도 세포내로 잘 들어갈 수 있도록 세포벽의 성분인 Mucopolysaccharide를 합성할 수 없게 하였거나 자외선과 변이원성물질에 대한 감수성을 높이기 위해 DNA repair enzyme을 합성하는 uvrB 유전자를 결손시켰거나(이 결손 과정에서 Biotin합성 유전자도 결손되어 Biotin 요구성 균주가 됨), 항생제 내성 인자인 R-factor plasmid는 Ampicillin resistant pKM101으로 이들이 존재하는 TA98 및 TA100은 TA1535 및 TA1537보다도 감수성이 커서 일반적으로



Scheme 3. Procedure for Identification of test strain

Screening 시험에서 잘 사용한다. OECD testing guideline에 규정된 4개의 균주, TA98, TA 100, TA1535, TA1537에서 결과가 음성인 화학물질로 화학구조상 반응성 결합기를 2개이상 가진 것은 DNA strain에 Bridge를 형성할 가능성이 있기 때문에 TA92 및 TA94로 추가시험할 필요가 있다.

WP2/uvrA등 균주는 E.coli균의 Tryptophan 유전자에 돌연변이를 유발하여 Tryptophan이 없으면 사멸하는 Tryptophan 요구성 균주(Tryptophan Auxotroph strain)이며 염기치환형 변이원성 물질의 검색에 사용한다. Salmonella를 이용한 시험에서 결과가 음성인 금속변이원성 물질 또는 Salmonella 균에 감수성이 낮은 Azo Dye, Hydrazine compound, Nitroso compound등에 대해 감수성이 높다. Plasmid pKM101을 가진 WP2uvrA/p균주는 Ampicillin에 내성을 가진다.

본 실험에서는 OECD Chemical testing guideline에 따라 균주로서는 TA98, TA 100, TA1535, TA1537를 사용하였으며 2차 변이원양성대조물질로는 2-Aminoanthracene(2-AA), 1차 변이원양성물질로는 2-Nitrofluorene(2-NF), Sod.Azide, 9-Aminoacridine.HCl (9-ACR)을 사용하였다.

2-6-2. Histidine 및 Tryptophan 요구성시험

멸균된 3 개의 Test tube(11x100mm)에 2-3-7에 서술된 방법으로 조제된 Top agar(Biotin만 첨가된 Top agar)와 100 ul Salmonella 전배양세포액을 가하고 vortex mixer로 혼화한 다음 Minimal Glucose Agar Plate에 부어 잘 펼치고 응고될 때까지 수평으로 유지하였다. 응고 후 상하를 뒤집어 37 C 배양기에 48 시간 배양한 후 Revertant 수를 목측하였다.

2-6-3. 막변이(Crystal violet)시험

멸균된 3 개의 Test tube(11x100mm)에 2-3-7에 서술된 방법으로 조제

표 14: 시험 균주의 특성

균주	변이유전자형	복귀변이 표적/형태	변이DNA 수복효소	막변이	Plasmid (R factor)	정상복귀 변이수	대표적 양성대조물질
Salmonella strain							
TA92	hisG46	GC BPST	+	+	pKM101		2-AA, MMC
TA94	hisD3052	GC FST	+	+	pKM101		2-AA, MMC
TA97	hisD6610	GC FST	uvrB	rfa	pKM101		
TA98	hisD3052	GC FST	uvrB	rfa	pKM101	15-35	2-AA, 2-NF
TA100	hisG46	GC BPST	uvrB	rfa	pKM101	80-150	2-AA, SA
TA102	hisG428	AT BPST	+	rfa	pKM101		
TA103	hisG428	AT BPST	+	+	pKM101		
TA104	hisG428	AT BPST	uvrB	rfa	pKM101		
TA1535	hisG46	GC BPST	uvrB	rfa		5-25	2-AA, SA
TA1537	hisC3076	GC FST	uvrB	rfa		2-20	2-AA, 9-ACR
TA1538	hisD3052	GC FST	uvrB	rfa		10-50	2-AA, BP
TA2637	hisC3076	GC FST	uvrB	rfa	pKM101		
E. coli(WP2)							
B/r	trpE	BPST	+	+			
uvrA	trpE	BPST	uvrB	+		5-20	2-AA, ENNG
uvrA/p	trpE	BPST	uvrB	+	pKM101		

* BPST: base pair substitution mutation type, FST: Frame shift mutation type, 2-AA: 2-aminoanthracene, BP: benzo(a)pyrene, MMC: mitomycin-C, 2-NF: 2-nitrofluorene, SA: sodium azide, 9-ACR: 9-aminoacridine, ENNG: N-ethyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine(ENNG)

된 Top agar(Histidine이 10배 더 첨가된 Top agar)와 100 ul Salmonella 전 배양세포액을 가하고 vortex mixer로 혼합한 다음 Minimal Glucose Agar Plate에 부어 잘 펼치고 응고될 때까지 수평으로 유지하였다. 응고 후 여지 disc(직경 6mm이며 시판되는 펀치로 제작)를 방사형으로 6개를 위치시키고 각 Disc에 10 ul 1mg/ml Crytal Violet을 묻힌 후 상하를 뒤집어 37 C 배양기에 24 시간 배양한 후 성장저지원의 직경을 Dial Califer(Mytsutoyo)를 이용하여 측정하였다. Crytal Violet은 2차 멸균증류수에 용해하였다. 성장저지원의 크기가 직경 14-5 mm 이상이면 막변이가 유발된 것으로 판단하였다.

2-6-4. Ampicillin 내성시험

멸균된 3 개의 Test tube(11x100mm)에 2-3-7에 서술된 방법으로 조제된 Top agar(Histidine이 10배 더 첨가된 Top agar)와 100 ul Salmonella 전 배양세포액을 가하고 vortex mixer로 혼합한 다음 Minimal Glucose Agar Plate에 부어 잘 펼치고 응고될 때까지 수평으로 유지하였다. 응고 후 여지 disc(직경 6mm이며 시판되는 펀치로 제작)를 방사형으로 6개를 위치시키고 각 Disc에 10 ul 8mg/ml ampicillin을 묻힌 후 상하를 뒤집어 37 C 배양기에 24 시간 배양한 후 성장저지원의 직경을 Dial Califer(Mytsutoyo)를 이용하여 측정하였다. Crytal Violet은 0.02 N NaOH에 용해하였다. 성장저지원의 크기가 직경 14-5 mm 이상이면 Ampicillin에 대한 내성인자가 없는 균주로 판단하였다.

2-6-5. 양성대조물질과 양성대조시험

2차 변이원 양성물질의 경우 각 균주당 멸균된 4 개의 Test tube (11x100mm)에 DMSO에 용해하고 차광한 20 ug/ml 2-Amonanthracene(2-AA) 100 ul를 가하고 2개의 Test tube에는 500 ul S9 mix를, 다른 2개의 Test tube에는 0.1M phosphate buffer(pH 7.4)를 가한 다음 2-3-7에 서술된 방법으로 조제된 Top agar와 100 ul 전배양세포액을 가하고 vortex mixer로 혼합한 다음

Minimal Glucose Agar Plate에 부어 잘 펼치고 응고될 때까지 수평으로 유지하였다. 응고 후 상하를 뒤집어 37 C 배양기에 48 시간 배양한 후 Revertant 수를 목적하였다.

1차 변이원 양성물질의 경우 TA98 균주에 대해서는 DMSO에 용해하고 차광한 10 ug/ml 2-Nitroflurene(2-NF)을, TA100과 TA1535 균주에 대해서는 멸균생리식염수에 용해하고 차광한 5 ug/ml Sod.Azide를, TA1537 균주에 대해서는 DMSO에 용해하고 차광한 625 ug/ml 9-Amonoacridine.HCl(9-ACR)을 가하고 0.1M phosphate buffer(pH 7.4)를 가하였다. 전과정을 Scheme 4에 표시하였다.

2-7. 시험물질의 조제

멸균 DMSO에 TDI 및 MDI(밀도 1.22)를 최고농도 50mg/ml로 조제하고 3배 계열희석하였다

2-8. 시험물질의 세포독성시험으로서의 농도결정 시험

2-8-1. 정성적 시험

TA98 균주를 이용하여 시험용액 5000ug/plate부터 3배 계열희석하여 각 희석 용액당 멸균된 4 개의 Test tube (11x100mm)에 멸균 DMSO에 용해하고 차광한 TDI 및 MDI 100 ul를 가하고 2개의 Test tube에는 500 ul S9 mix를, 다른 2개의 Test tube에는 0.1M phosphate buffer(pH 7.4)를 가한 다음 2-3-7에 서술된 방법으로 조제된 Top agar와 100 ul 전배양세포액을 가하고 vortex mixer로 혼합한 다음 Minimal Glucose Agar Plate에 부어 잘 펼치고 응고될 때까지 수평으로 유지하였다. 응고 후 상하를 뒤집어 37 C 배양기에 48 시간 배양한 후 Background Lawn의 형성 여부를 관찰하였다.

2-8-2. 정량적 시험

TA98 균주를 이용하여 시험용액 5000ug/plate부터 3배 계열희석하여 각 희석 용액당 멸균된 4 개의 Test tube (11x100mm)에 DMSO에 용해하고 차광한 TDI 및 MDI 100 ul를 가하고 2개의 Test tube에는 500 ul S9 mix를, 다른 2 개의 Test tube에는 0.1M phosphate buffer(pH 7.4)를 가한 다음 2-6-3 시험에 쓰인 것과 동일한 Top agar와 400000배 희석한 전배양세포액 100ul(Plate 당 약 250개의 colony가 형성될 것으로 추정)를 가하고 vortex mixer로 혼합한 다음 Minimal Glucose Agar Plate에 부어 잘 펼치고 응고될 때까지 수평으로 유지하였다. 응고 후 상하를 뒤집어 37 C 배양기에 48 시간 배양한 후 Revertant 수를 목측하였다.

2-9. 시험물질의 변이원성 시험

OECD testing guideline는 시험을 Triplicate로 할 것을 규정하고 있으며 일본의 경우는 Duplicate를 권장하고 있다. 본 시험에서는 Duplicate로 행하였다.

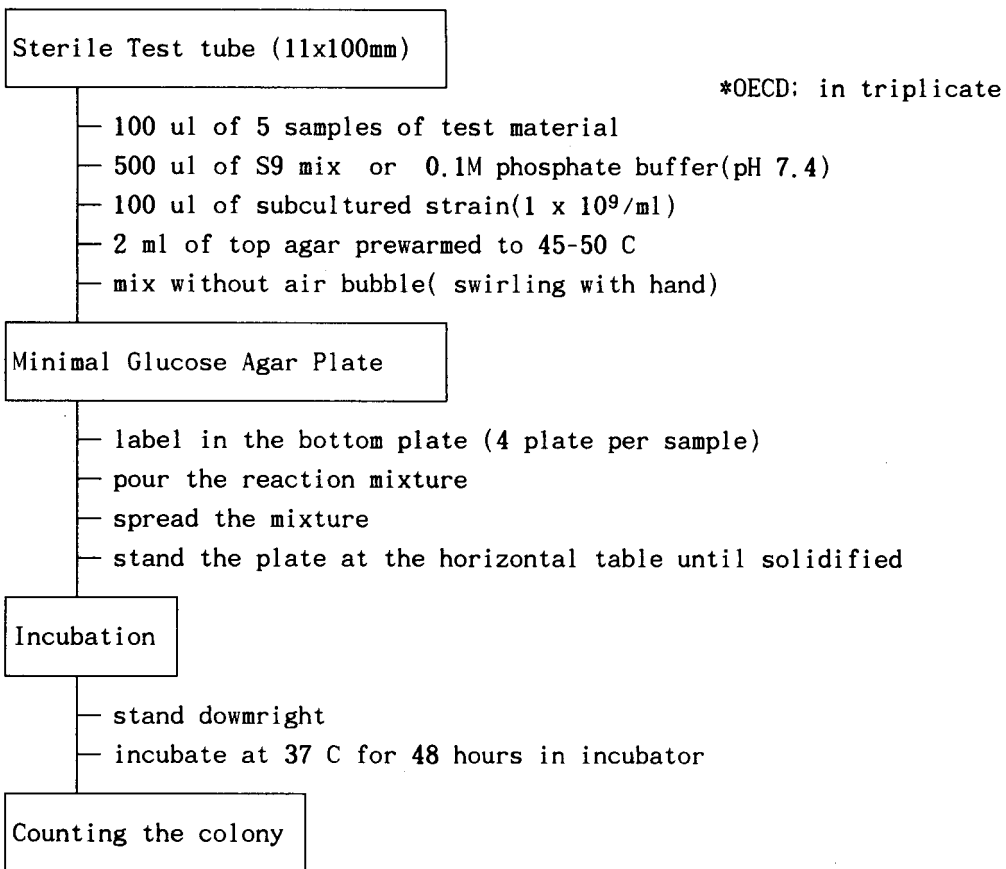
각 균주당 시험물질 각 농도당 멸균된 4 개의 Test tube (11x100mm)에 DMSO에 용해하고 차광한 TDI 및 MDI 100 ul를 가하고 2개의 Test tube에는 500 ul S9 mix를, 다른 2개의 Test tube에는 0.1M phosphate buffer(pH 7.4)를 가한 다음 2-3-7에 서술된 방법으로 조제된 Top agar와 100 ul 전배양세포액을 가하고 vortex mixer로 혼합한 다음 Minimal Glucose Agar Plate에 부어 잘 펼치고 응고될 때까지 수평으로 유지하였다. 응고 후 상하를 뒤집어 37 C 배양기에 48 시간 배양한 후 Revertant 수를 목측하였다. 전과정을 Scheme 4에 표시하였으며 이제까지의 시험의 전흐름도를 Scheme 5에 표시하였다(Ames etal 1973, 1975, Anderson etal 1980, Brusick 1991, Hoffman 1991, Maron etal 1983, NTP 1986, 労働省化學物質調査課 1991, 日本労働省安全衛生部 化學物質調査課 1990, 石官 基 1991, 김용화 1988).

2-10. 변이원성 결과의 평가방법

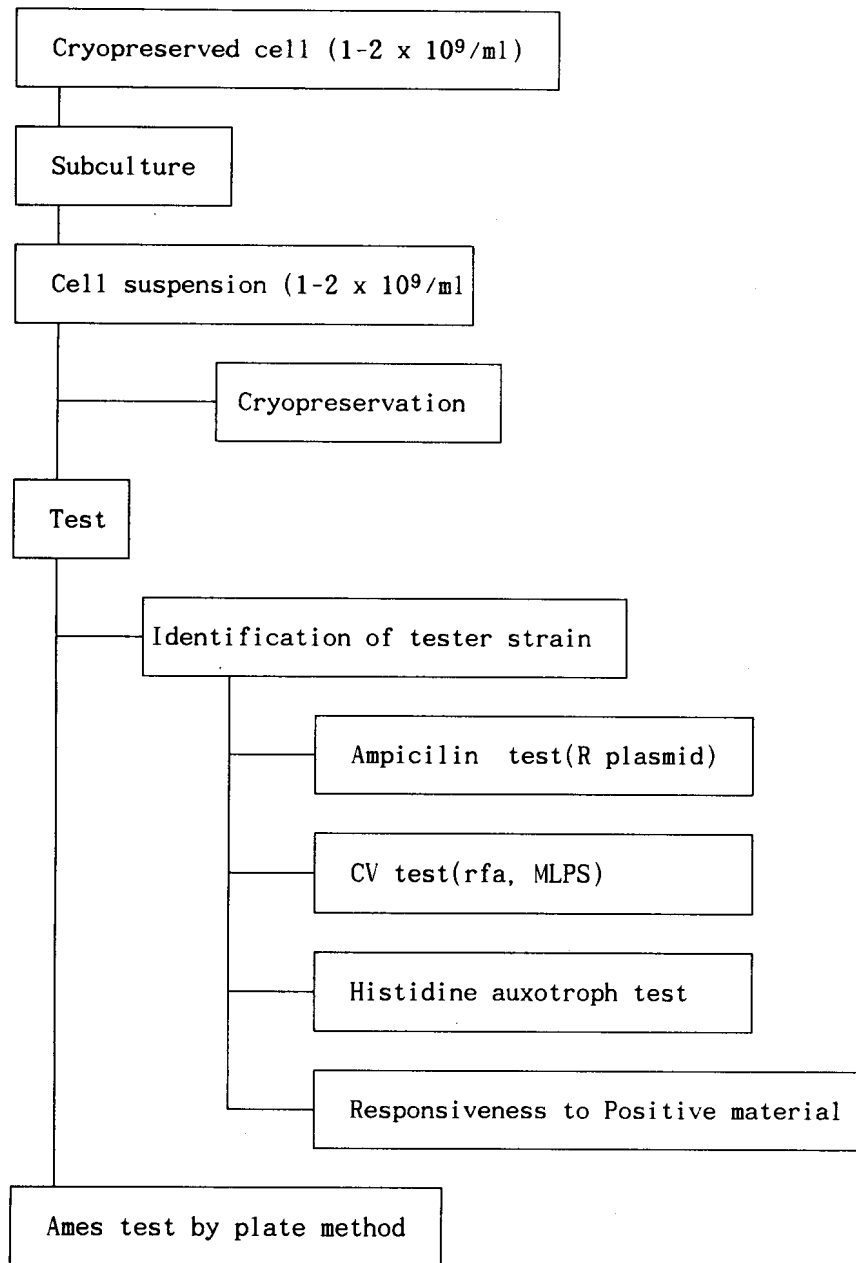
변이원성 결과를 양성으로 판정하는데 있어서 중요한 요인으로는 우선 각 균주의 Spontaneous Revertants/Plate수가 국제적으로 공인된 범위 안에 있어야 한다는 점이다. 국제적으로 공인된 각 균주의 Spontaneous Revertants/Plate수는 다음과 같다. TA 98: 15-35, TA 100: 80-150, TA 1535: 5-25, TA 1537: 2-20. 다음으로 변이유발이 3 개농도 이상에서 용량의 존성이 있어야한다는 점이다. 마지막으로 내성인자를 가지고 있는 TA98 및 TA100균주는 대조군에 비해 2배이상 증가하여야하며 내성인자를 가지고 있지 않은 TA1535 및 TA1537균주는 대조군에 비해 3배이상 증가하여야한다.

화학물질간의 변이원성 Potential을 비교하는 방법도 있는데 이는 비활성(Specific activity)로 표시한다. 비활성은 직선성의 용량반응관계가 직선인 범위에서의 시험물질의 최고농도치를 선택하여 다음과 같은 식으로 구한다.

$$\frac{(\text{해당농도에서의 Revertants/plate}) - (\text{대조군의 Revertants/plate})}{\text{해당농도(mg/plate)}}$$



Scheme 4: Procedure for Ames test using plate method



Scheme 5. Overall flow chart for Ames test

3. 시험결과 및 토론

먼저 시험균주의 특성이 유지되었는지를 확인하기 위하여 국립보건안전 연구원에서 분양받은 균주들의 특성을 동정하는 시험, Histidine Auxotroph 시험, Crystal violet 투과성 시험 및 Ampicillin 내성 시험 결과를 표 15, 표 16, 표 17에 나타내었다. 시험균주는 OECD에서 권고하고 있는 TA98, TA100, TA1535, TA1537로서 균주들의 Histidine 요구성 시험에서 Revertants 수의 평균이 각각 20, 135, 11, 3으로 표 14에 규정된 정상복귀돌연변이수의 범위내에 들어 이들 균주들은 Histidine 요구성을 그대로 보존하고 있음을 확인하였다(표 15).

막변이성을 그대로 유지하고 있는지의 여부를 동정하는 Crytal violet 시험에서 각 균주에 대해 저지원의 평균 지름이 각각 18mm, 20mm, 21mm, 21mm로서 막변이 유발 기준인 6-8mm Disc에 14mm 저지원보다도 더 크게 저지원을 형성하여 막변이성도 그대로 유지하고 있다(표 16). 그리고 전배양과정이나 각종 시험중 소실 또는 회복되는 경향이 많은 R factor인 Ampicillin 내성 Factor의 경우 이들을 가지고 있는 TA98 및 TA100 균주에 있어서 저지원이 6mm로 Disc의 지름인 6mm밖에 나타내지 못하여 내성인자를 보존하고 있었다. 그러나 내성인자가 결여된 균주인 TA1535, TA1537균주에 있어서 저지원의 지름이 18mm, 16mm였다(표 17). 이상의 균주 특성시험결과로 보아 분양받은 균주들은 시험에 적합한 조건을 보존하고 있다고 사료된다.

균주 특성중 또 하나는 양성변이원성 물질에 대한 균주들의 반응성이다. 양성변이원성물질은 대사를 받지 않아도 변이원성을 보이는 1차 변이원성물질과 대사를 받아야 변이원성을 보이는 2차 변이원성물질로 나뉘는데 표 18에 나타난 바와 같이 각 균주에 대하여 이들 알려진 변이원성물질들은 좋은 반응을 보였으나 1차변이원성 물질의 경우 S9 존재하에서 오히려 적은 반응성을 보인 것은 이들이 대사되어 활성이 적은 물질로 변하였기 때문인 것으로 사료되며

II 15: Identification of tester strains: Histidine auxotroph test

STRAIN	REVERTANT/PLATE		
	P1	P2	Mean
TA 98	21	19	20
TA 100	130	140	135
TA 1535	9	12	11
TA 1537	1	5	3

II 16: Identification of tester strains: Crystal violet test

STRAIN	INHIBITION ZONE(mm in diameter)				
	P1	P2	P3	P4	Mean
TA 98	18	18	18	19	18
TA 100	18	20	21	22	20
TA 1535	20	21	21	20	21
TA 1537	22	21	20	22	21

II 17: Identification of tester strains: Ampicillin resistance test

STRAIN	INHIBITION ZONE(mm in diameter)				
	P1	P2	P3	P4	Mean
TA 98	6	6	6	6	6
TA 100	6	6	6	6	6
TA 1535	19	18	18	17	18
TA 1537	17	16	16	16	16

II 18: Identification of tester strains: Mutagenic potentials of positive materials(known mutagens)

STRAIN	POSITIVE MATERIAL	CONC. (ug/plate)	REVERTANT/PLATE					
			- S9			+ S9		
			P1	P2	Mean	P1	P2	Mean
TA98	NEG CON	0	14	17	16	37	37	37
	2-NF	1	352	360	356	166	160	163
	B(a)P	5	15	20	18	148	134	141
	2-AA	2	26	13	20	770	710	740
TA100	NEG CON	0	136	111	124	110	110	110
	Sod Azide	0.5	591	494	543	35	42	39
	B(a)P	5	ND	ND		ND	ND	
	2-AA	2	140	134	137	1136	1482	1309
TA1535	NEG CON	0	9	14	12	27	20	24
	Sod Azide	0.5	564	376	470	26	27	27
	B(a)P	5	15	10	13	35	19	27
	2-AA	2	9	11	10	208	238	223
TA1537	NEG CON	0	8	8	8	6	6	6
	9-AC	1	15	29	22	29	31	30
	B(a)P	5	6	4	5	78	88	83
	2-AA	2	6	5	6	101	73	87

NEG CON: DMSO, 2-NF: 2-nitrofluorene, B(a)P: benzo(a)pyrene, 2-AA: 2-aminoanthracene, 9-AC: 9-aminoacridine

9-ACR의 경우는 작은 반응성을 보였으나 원인을 확인할 수 없었다.

다음으로 TDI, MDI 등이 *Salmonella* 군주에 대하여 직접세포독성(Direct cytotoxicity)을 유발하는지의 여부를 검색함으로써 이들 물질의 시험농도구간을 결정하기 위하여 정성적 및 정량적 세포독성시험을 수행하였다. 먼저 Pour plate method를 이용하여 이들 시험물질이 TA98군주들의 Background lawn 형성 여부와 Spontaneous revertants/plate를 구하였다(표 5). 음성대조군은 용매인 DMSO를, 양성대조물질로는 2-NF, 2-AA를 사용하였으며 이들 모두 정상적인 반응성을 보였다. TDI, MDI의 최고농도는 5000 ug/plate이었으며 4배 계열 희석하였다. S9이 존재하지 않을 때 Revertants수는 대조군과 유사하였으며 Background lawn도 형성되었다. 그러나 2500 ug/plate 이상의 농도에서는 실같은 백색 침전물이 형성되어 시험에 지장을 주었다. 한편 S9 존재시 20 ug/plate 이상의 농도에서는 Revertants수가 2배 이상 증가하는 경향을 보였으나 새로 형성된 Revertants Colony를 계대 배양하여 군 특성 동정시험은 하지않았다. 이러한 정성적 세포독성시험 결과는 이들 물질들이 변이원성을 질일 가능성을 시사해 주었으며 또한 Background lawn이 형성되는 것으로 보아 직접세포독성은 나타내지 않는 것으로 보이거나 본 연구 결과와 상이한 결과인 500 ug/plate 이상의 농도에서 세포독성을 유발한다는 Anderson등(1980)의 보고를 검토하기 위하여 본 연구에서는 정량적 세포독성시험을 수행하였다.

10배 이상의 Histidine을 함유한 plate당 400 -2000개의 군주 Colony가 형성되도록 일정 개수의 군주를 Top agar에 가하였다. Table 6에서 보는 바와 같이 TDI는 S9이 존재하지 않은 상태에서 저농도에서 625 ug/plate까지 용량 의존적으로 TA98 군주의 생존률을 감소시키다가 625 ug/plate이상의 농도에서는 오히려 생존률을 증가시키는 Biphasic한 성질을 나타냈다. S9 존재하에서도 유사한 경향을 보였으나 생존율은 약간 증가하였다. 이와같은 TDI의 TA98에 대한 직접세포독성 경향은 MDI의 경우에 있어서도 관찰되었으나 TDI보다 MDI가 직접세포독성이 더욱 강하여 76 ug/plate에서도 90% 가까이 사멸시켰다. S9 존재하지 않을 때보다 S9이 존재할 때 세포독성이 적게 나타나는 정향

⌘ 19: Qualitative cytotoxicity of TDI and MDI using TA98 (background lawn and spontaneous revertants obtained with TA98 following exposure to TDI or MDI and known mutagens in pour plate method)

COMPOUND	CONC. (ug/plate)	S9 MIX	BACKGROUND LAWN		REVERTANT/PLATE		
			P1	P2	P1	P2	Mean
Experiment 1							
NEG CON.	0	-	P	P	16	8	12
TDI	5	-	P	P	22	27	25
	20	-	P	P	16	22	19
	78	-	P	P	12	22	17
	313	-	P	P	12	18	15
	1250	-	P	P	20	11	16
	5000	-	NDppt	NDppt	NDppt	NDppt	
	MDI	5	-	P	P	20	19
20		-	P	P	12	13	13
78		-	P	P	22	24	23
313		-	P	P	19	16	18
1250		-	P	P	21	20	21
5000		-	NDppt	NDppt	NDppt	NDppt	
2-NF		1	-	P	P	367	413
2-AA	5	-	P	P	23	39	31
Experiment 2							
NEG CON	0	+	P	P	28	26	27
TDI	5	+	P	P	19	29	24
	20	+	P	P	19	33	26
	78	+	P	P	67	86	77
	313	+	P	P	54	62	58
	1250	+	NDppt	NDppt	NDppt	NDppt	
	5000	+	NDppt	NDppt	NDppt	NDppt	
	MDI	5	+	P	P	22	30
20		+	P	P	34	25	30
78		+	P	P	45	46	46
313		+	P	P	41	42	42
1250		+	NDppt	NDppt	NDppt	NDppt	
5000		+	NDppt	NDppt	NDppt	NDppt	
2-NF		1	+	P	P	172	119
2-AA	5	+	P	P	167	118	143

II 19 (continued)

Experiment 3

NEG CON	0	+	P	P	29	25	27
TDI	5	+	P	P	53	51	52
	20	+	P	P	53	54	54
	78	+	P	P	51	54	53
	313	+	P	P	65	54	60
	1250	+	NDppt	NDppt	39	23	31
	5000	+	NDppt	NDppt	NDppt	NDppt	
MDI	5	+	P	P	35	30	33
	20	+	P	P	46	38	42
	78	+	P	P	42	38	40
	313	+	P	P	66	88	77
	1250	+	NDppt	NDppt	72	55	64
	5000	+	NDppt	NDppt	NDppt	NDppt	
B(a)P	5	+	P	P	148	134	141

P: present, NDppt: not detectable due to the precipitates of materials

表 20: Quantitative cytotoxicity of TDI and MDI using TA98 (Spontaneous revertants obtained with TA98 following exposure to TDI or MDI in pour plate method)

COMPOUND	CONC. (ug/plate)	REVERTANT/PLATE					
		- S9			+ S9		
		P1	P2	Mean	P1	P2	Mean
NEG CON	0	1254	987	1121	1145	1354	1250
TDI	79	912	1046	979	1332	1008	1170
	157	696	457	577	486	503	495
	313	213	310	262	472	340	406
	625	5	3	4	158	16	87
	1250	1	3	2	570	546	558
	1250	125	183	154	1096	812	954
	5000	NDppt	NDppt		NDppt	NDppt	
MDI	79	55	100	78	264	324	294
	157	25	20	23	118	44	61
	313	18	6	12	54	170	112
	625	5	1	3	359	560	460
	1250	24	20	22	832	528	680
	2500	NDppt	NDppt		NDppt	NDppt	
	5000	NDppt	NDppt		NDppt	NDppt	

* NDppt: not detectable due to the precipitates of materials

한 기전은 알 수 없으나 아마도 이들 물질이 단백질과 결합하여 세포독성이 적게 유발되든가, S9에 의해 무독화되든가 아니면 물과 반응시 생성되는 Radical등 각종 중간체의 세포독성이 적게 생성되기 때문이 아닌가 추측된다. 반면 표 7에 나타난 바와 같이 TA100 균주에 대해서는 이들 물질들이 아무런 영향을 주지 않았다.

이상의 정성적 정량적 세포독성 시험 결과는 변이원성 시험에서 일반적으로 인정되고 있으며 널리 활용되고 있는 정성적 세포독성 시험인 Background lawn으로 확인하는 시험보다는 정량적 세포독성 시험을 수행할 필요가 있으며 TDI 및 MDI는 균주에 따라 다르기는 하여도 직접세포독성이 강한 물질이므로 시험최고농도를 79 ug/plate하여 변이원성을 확인하여야한다는 것을 시사한다. 그러나 Anderson등(1980), NTP등(1986), 김용화등(1988)이 최고 농도를 5000 ug/plate로 하였으므로 이들 보고와 비교하기 위하여 본 연구에서도 최고농도를 5000 ug/plate로 하였다.

표 8은 TDI 및 MDI의 TA98 균주에 대한 변이원성 시험 결과로서 TDI 및 MDI 모두 S9이 존재하지 않은 상태에서는 아무런 차이가 관찰되지 않았으나 S9가 존재한 상태에서는 TDI의 경우 185 ug/plate 이상의 농도에서 MDI의 경우에는 1667 ug/plate 이상의 농도에서 농도의존적으로 Revertants가 증가하였다. 또한 20 ug/plate에서도 약간 의 변이원성이 확인되어 20 ug/plate 이하의 농도에서도 시험하였다(표 9). 그 결과 0.025 ug/plate 농도까지 유사한 현상을 보였다. 이러한 결과는 2.4TDI와 2.6TDI 혼합물(80:20)이 TA98, TA100 균주에 대해서 S9 존재하 용량 의존적으로 변이원성을 유발하였다고 보고한 Anderson등(1980), NTP(1986), 김등(1988) 결과와 일치하여 이들 물질이 약한 Frame shift형 변이원성 물질임이 재확인되었다. 그러나 표 6에 나타난 바와 같이 TDI 및 MDI가 S9이 존재하지 않아도 157 ug/plate라는 저농도에서도 TA98 균주의 생존률을 저하시키는 강력한 세포독성물질이며 1250 ug/plate 이상의 농도에서는 오히려 Revertants수를 증가시키는 현상에 근거할 때 표 8과 표 9에 나타난 바처럼 TA98에 대한 TDI 및 MDI의 S9 비존재하 Revertants

⌘ 21: Quantitative cytotoxicity of TDI and MDI using TA100 (Spontaneous revertants obtained with TA98 following exposure to TDI or MDI in pour plate method)

COMPOUND	CONC. (ug/plate)	REVERTANT/PLATE					
		- S9			+ S9		
		P1	P2	Mean	P1	P2	Mean
NEG CON	0	482	478	480	525	500	513
TDI	79	447	451	449	526	501	514
	157	493	443	468	519	540	530
	313	455	499	477	549	505	552
	625	390	467	429	543	551	547
	1250	460	474	467	560	555	558
	1250	461	450	456	551	565	558
	5000	NDppt	NDppt		NDppt	NDppt	
MDI	79	400	456	428	561	551	556
	157	461	512	487	496	522	509
	313	512	482	497	580	575	578
	625	497	501	499	532	551	542
	1250	423	421	422	524	526	525
	2500	NDppt	NDppt		NDppt	NDppt	
	5000	NDppt	NDppt		NDppt	NDppt	

* NDppt; not detectable due to the precipitates of materials

Table 22: Revertants colony counts and means obtained with TA 98 following exposure to TDI or MDI and known mutagens in pour plate method(1)

COMPOUND	CONC. (ug/plate)	REVERTANT/PLATE					
		- S9			+ S9		
		P1	P2	Mean	P1	P2	Mean
NEG CON	0	17	10	14	27	22	25
TDI	20	15	22	19	52	35	44
	62	16	13	15	51	28	40
	185	16	16	16	42	67	55
	556	11	15	13	91	61	76
	1667	16	40	28	125	148	137
	5000	NDppt	NDppt		NDppt	NDppt	
MDI	20	18	14	16	21	14	18
	62	18	15	17	26	36	18
	185	10	11	11	36	23	12
	556	8	22	15	41	34	38
	1667	26	30	28	32	79	56
	5000	NDppt	NDppt		NDppt	NDppt	
2-NF	1	341	341	341	ND	ND	
2-AA	2	16	22	19	1166	1082	1124

* NDppt: not detectable due to the precipitates of materials

ND : not determined

Table 23: Revertants colony counts and means obtained with TA 98 following exposure to TDI or MDI and known mutagens in pour plate method(2)

COMPOUND	CONC. (ug/plate)	REVERTANT/PLATE					
		- S9			+ S9		
		P1	P2	Mean	P1	P2	Mean
NEG CON.	0	21	19	20	28	31	29
TDI	0.08	17	18	18	32	31	32
	0.25	23	19	21	36	37	37
	0.74	23	17	20	37	31	34
	2	11	24	18	56	36	46
	7	17	19	18	59	62	61
	20	24	15	20	61	46	54
MDI	0.08	20	16	18	46	35	41
	0.25	19	27	23	43	52	48
	0.74	17	15	16	41	35	38
	2	21	12	17	23	44	34
	7	17	22	20	34	50	42
	20	18	21	20	42	53	48
2-NF	1	420	434	427	ND	ND	
2-AA	2	26	13	20	770	710	740

* ND: not determined

수가 대조군과 유사한 수치를 보인 것은 아마도 이러한 세포독성에 기인한 것으로 실제 이를 감안하면 수치가 더 크게 나타날 것으로 추측되며 이러한 견해는 인간의 말초 혈액 림파구등 포유류 배양세포를 이용한 Chromosome aberration 시험의 일종인 In vitro cytogenetic assay를 이용한 변이원성 시험에서 S9에 관계없이 TDI는 0.019 $\mu\text{l/ml}$ 까지, MDI는 0.54 $\mu\text{l/ml}$ 까지 염색체 이상과 SCE를 용량의존성없이 유발하였다고한 Maak-Paakkana등(1987)의 결과에 근거하면 타당한 것으로 추측되며, S9 존재하 1667 $\mu\text{g/plate}$ 이상의 농도에서 Revertants가 증가한 것은 TDI 및 MDI가 1250 $\mu\text{g/plate}$ 이상의 농도에서 균주의 Revertants수를 증가시키는 성질에 의한 것으로 추측된다. 따라서 현재 약한 Frame shift형 변이원성 물질이라고 국제적으로 평가를 하게한 기초독성 자료인 Anderson등(1980), NTP(1986), 김등(1988) 결과는 이러한 결과에 근거하여 재평가할 필요가 있으며 이를 위하여 보다 진전된 시험이 요구된다고 사료되어 본 연구실에서 이미 이를 규명하기 위한 시험을 추진하고 있다.

표 10은 TDI 및 MDI의 TA100 균주에 대한 변이원성 시험 결과로서 TDI 및 MDI 모두 S9이 존재하지 않은 상태에서는 아무런 차이가 관찰되지 않았으나 S9가 존재한 상태에서는 TDI의 경우 185 $\mu\text{g/plate}$ 이상의 농도에서 MDI의 경우에는 62 $\mu\text{g/plate}$ 이상의 농도에서 농도의존적으로 Revertants가 증가하였다. 이러한 결과는 Anderson등(1980), NTP(1986), 김등(1988) 결과와 일치하여 이들 물질이 약한 Base pair substitution형 변이원성 물질임이 재확인되었다. 표 7에 나타난 바와 같이 TDI 및 MDI는 S9에 관계없이 TA100 균주의 생존률에 영향을 나타내지 않았다.

표 11과 표 12는 TDI 및 MDI의 TA1535 및 TA1537 균주에 대한 변이원성 시험 결과로서 TDI 및 MDI 모두 S9이 존재하지 않은 상태에서는 아무런 영향을 미치지 않았다.

이상의 시험결과를 종합하면 국립보건안전연구원에서 분양받았으며 OECD에서 권고하고 있는 TA98, TA100, TA1535, TA1537 균주들은 Histidine Auxotroph, Crystal violet 투과성 및 Ampicillin 내성등 균주특성을 양호하

II 24: Revertants colony counts and means obtained with TA100 following exposure to TDI or MDI and known mutagens in pour plate method

COMPOUND	CONC. (ug/plate)	REVERTANT/PLATE					
		- S9			+ S9		
		P1	P2	Mean	P1	P2	Mean
NEG CON	0	136	111	124	110	110	110
TDI	2	127	147	137	126	147	137
	7	158	152	155	134	140	137
	20	116	97	107	143	117	130
	62	154	127	141	177	132	155
	185	120	134	127	205	197	201
	556	160	142	151	218	250	234
	1667	132	118	125	244	212	228
	5000	NDppt	NDppt		NDppt	NDppt	
MDI	2	134	134	134	112	120	116
	7	120	102	111	118	123	121
	20	133	155	144	158	157	158
	62	120	131	126	153	206	180
	185	113	161	137	180	158	169
	556	162	142	152	164	226	195
	1667	142	136	139	174	190	182
	5000	NDppt	NDppt		NDppt	NDppt	
SOD AZIDE	1	591	494	543	ND	ND	
2-AA	2	140	134	137	1136	1482	1309

* NDppt: not detectable due to the precipitates of materials

ND : not detrmined

Table 25: Revertants colony counts and means obtained with TA1535 following exposure to TDI or MDI and known mutagens in pour plate method

COMPOUND	CONC. (ug/plate)	REVERTANT/PLATE					
		- S9			+ S9		
		P1	P2	Mean	P1	P2	Mean
NEG CON	0	10	7	9	12	11	12
TDI	20	11	15	13	8	8	8
	62	6	14	10	11	13	12
	185	6	11	9	12	9	11
	556	18	6	12	15	11	13
	1667	5	13	9	9	10	10
	5000	NDppt	NDppt		NDppt	NDppt	
MDI	20	10	8	9	9	19	14
	62	11	11	11	10	7	9
	185	11	6	9	7	15	11
	556	10	3	7	6	10	8
	1667	7	14	11	17	12	15
	5000	NDppt	NDppt		NDppt	NDppt	
SOD AZIDE	1	446	480	463	ND	ND	
2-AA	2	17	13	15	125	115	120

* NDppt: not detectable due to the precipitates of materials

ND : not determined

⌘ 26: Revertants colony counts and means obtained with TA1537 following exposure to TDI or MDI and known mutagens in pour plate method

COMPOUND	CONC. (ug/plate)	REVERTANT/PLATE					
		- S9			+ S9		
		P1	P2	Mean	P1	P2	Mean
NEG CON	0	3	3	3	11	6	9
TDI	20	11	3	7	14	6	10
	62	8	5	7	12	14	13
	185	7	2	5	13	12	13
	556	3	4	4	13	11	12
	1667	1	4	3	13	12	13
	5000	NDppt	NDppt		NDppt	NDppt	
MDI	20	5	4	5	6	4	5
	62	3	7	5	9	5	7
	185	3	4	4	6	7	7
	556	8	6	7	9	8	9
	1667	6	9	8	5	0	3
	5000	NDppt	NDppt		NDppt	NDppt	
9-AC	1	24	21	23	ND	ND	
2-AA	2	5	6	6	101	73	87

* NDppt: not detectable due to the precipitates of materials

ND : not detrmined

게 보존하고 있어 시험에 적합한 조건을 보존하고 있었으며 TA98, TA100, TA1535, TA1537 균주들은 양성변이원성 물질에 대하여 양호한 반응성을 보였다. TDI 및 MDI는 TA98 균주에 대하여 정성적으로는 세포독성을 유발하지 않았으나 정량적으로는 직접세포독성이 강한 물질인 것으로 사료되며 TA98 및 TA100 균주에 대하여 약한 Frame shift형 및 Base pair substitution형 변이원성 물질임이 재확인되었으나 TA98 균주의 생존률을 저하시키는 강력한 세포독성물질이라는 사실을 주목해야한다. 한편 TDI 및 MDI는 TA1535 및 TA1537 균주에 대하여 아무런 영향을 미치지 않았다. 따라서 TDI 및 MDI는 TA98 균주에 대해서 S9이 존재한 상태에서 약한 Frame shift형 변이원성 물질임이 재확인되었으나 정량적 세포독성을 유발하는 물질이므로 국제적으로 S9 존재하에서만 약한 Frameshift형 변이원성 물질이라고한 기존의 시험 결과들 (Anderson et al 1980, NTP, 1986, Ong T et al 1987, 김용화 1988)을 재평가할 필요가 있으며 이를 위하여 보다 진전된 시험이 요구된다.

마지막으로 본 연구는 『유해성심사에 필요한 화학물질의 독성등에 관한 자료를 제출해야 하는 신규화학물질 신고자는 “미생물을 이용한 복귀돌연변이 시험과 포유류 배양세포를 이용한 염색체 이상시험 또는 이와 동등이상의 결과를 얻을 수 있는 시험(소핵시험, 우성치사시험등 포유동물 개체의 생식세포를 이용하는 변이원성시험)이나 발암성시험”자료를 제출해야한다』는 92년 개정된 산업안전보건법 및 시행세칙 제83조 규정(노동부 1989, 노동부 1992)에 의거 신고자가 유해성 조사 결과를 제출해야 하지만 “시험을 자체적으로 실시하기 곤란한 경우에는 노동부장관이 인정하는 전문조사기관에 화학물질의 유해성 조사를 의뢰할 수 있다”는 산업안전보건법 시행규칙 제 83조에 따라 전문조사기관으로 인정된 산업보건연구원에 의뢰할 경우 이를 수행할 능력을 보유할 목적으로 우선적으로 유전독성뿐만 아니라 발암성 예측시험에 1차적으로 요구되는 Ames 시험 방법을 정립하고자 수행되었다는 것을 언급하고 싶다. 그러나 다음은 무슨 시험을 정립해야할 것인가 생각할 때 연구자의 한사람으로서 갈등을 느낀다는 것을 숨길 수 없다. 이는 미국(USEPA 1986b, Dearfield

1991) 이나 일본(勞働安全衛生法規 第 34條, 勞働省化學物質調査課 1991, 日本勞働省安全衛生部 1990)의 경우와 달리 산업안전보건법 및 시행세칙 제83조 규정(노동부 1989, 노동부 1992)의 취지가 유전독성물질을 규제하기 위한 것인지 발암성물질을 규제하기 위한 것인지 불분명하여 이들 질환의 직업병을 예방에 있어서 허점이 있으며 규정된 시험항목 또한 한정됨없이 광범위하게 요구되어 신규화학물질 신고자에게 불만요인으로 작용하여 민원을 증가시킬 소지가 있을 뿐만아니라 화학물질의 국제적 무역에 있어서 하나의 장벽을 만들 수 있다는데 기인한다. 따라서 일본이나 미국에서와 같이 차세대 독성(유전독성)을 예측할 수 있는 변이원성시험은 물론 발암성 예측시험자료가 요구될 수 있도록 하기 위하여 92년 개정된 산업안전보건법 및 시행세칙 제83조 규정(노동부 1989, 노동부 1992)인 “미생물을 이용한 복귀돌연변이 시험과 포유류 배양세포를 이용한 염색체 이상시험 또는 이와 동등이상의 결과를 얻을 수 있는 시험이나 발암성시험자료를 제출해야한다”는 “차세대독성(유전독성)을 예측할 수 있는 변이원성시험, 발암성을 예측할 수 있는 변이원성시험과 이와 동등 이상의 결과를 얻을 수 있는 시험이나 (2년)발암성시험자료를 제출해야한다” 즉시 개정되어야 함은 물론 시험항목들을 미국의 경우(그림 8, 그림 11)와 같이 정확히 규정할 것을 제안한다. 그 결과 등록시 제출되는 화학물질의 한정된 변이원성시험 Set를 제공함으로써 규제에 필요한 시험 요구사항을 최소한으로 줄여 민원을 감소시키고 예산과 인력 낭비를 막으며 더 나아가 무역장벽을 피하고 효과적으로 직업병을 예방할 수 있다고 생각한다. 이와 같은 취지에 따라 하루빨리 노동부고시 제 92-25중 요구되는 시험항목이 개정되어 본 연구원이 신규화학물질 유해성 조사 전문기관으로써 유전독성시험을 체계적으로 원활히 수행할 수 있어야 하겠다.

국 문 요 약

본 연구는 『유해성심사에 필요한 화학물질의 독성동에 관한 자료를 제출해야 하는 신규화학물질 신고자는 “미생물을 이용한 복귀돌연변이 시험과 포유류 배양세포를 이용한 염색체 이상시험 또는 이와 동등이상의 결과를 얻을 수 있는 시험(소핵시험, 우성치사시험등 포유동물 개체의 생식세포를 이용하는 변이원성시험)이나 발암성시험”자료를 제출해야한다』는 92년 개정된 산업안전보건법 및 시행세칙 제83조 규정에 의거 신규화학물질 신고자가 유해성 조사 결과를 제출해야 하지만 “시험을 자체적으로 실시하기 곤란한 경우에는 노동부장관이 인정하는 전문조사기관에 화학물질의 유해성 조사를 의뢰할 수 있다”는 산업안전보건법 시행규칙 제 83조에 따라 전문조사기관으로 인정된 산업보건연구원에 의뢰할 경우 이를 수행할 능력을 보유할 목적으로 우선적으로 유전독성뿐만 아니라 발암성 예측시험에 1차적으로 요구되는 Ames 시험 방법을 정립하고자 수행되었으며 화학물질중 직업성 천식물질로 잘 알려져 있지만 변이원성 결과에 대해서 논란의 여지가 있는 TDI 및 MDI를 예를 들어 시험하였다. 그 결과,

1. 국립보건안전연구원에서 분양받았으며 OECD에서 권고하고 있는 TA98, TA100, TA1535, TA1537 균주들의 특성(Histidine Auxotroph, Crystal violet 투과성 및 Ampicillin 내성)은 균주 특성시험결과 시험에 적합한 조건을 보존하고 있었다.
2. TA98, TA100, TA1535, TA1537 균주들은 양성변이원성 물질에 대하여 양호한 반응성을 보였다.
3. TDI 및 MDI는 TA98 균주에 대하여 정성적으로는 세포독성을 유발하지 않았으나 정량적으로는 직접세포독성이 강한 물질인 것으로 사료된다.

4. TDI 및 MDI는 TA98 및 TA100 군주에 대하여 약한 Frame shift형 및 Base pair substitution형 변이원성 물질임이 재확인되었으나 TA98 군주의 생존률을 저하시키는 강력한 세포독성물질이므로 재평가할 필요가 있으며 이를 위하여 보다 진전된 시험이 요구된다.

5. TDI 및 MDI는 TA1535 및 TA1537 군주에 대하여 아무런 영향을 미치지 않았다.

그러나 미국이나 일본의 경우와 달리 산업안전보건법 및 시행세칙 제83조 규정의 취지가 유전독성물질을 규제하기 위한 것인지 발암성물질을 규제하기 위한 것인지 불분명하여 이들 질환의 직업병을 예방에 있어서 허점이 있으며 규정된 시험항목 또한 한정됨없이 광범위하게 요구되어 신규화학물질 신고자에게 불만요인으로 작용하여 민원을 증가시킬 소지가 있을 뿐만아니라 화학물질의 국제적 무역에 있어서 하나의 장벽을 만들 수 있다고 사료되므로 일본이나 미국에서와 같이 차세대 독성(유전독성)을 예측할 수 있는 변이원성시험은 물론 발암성 예측시험자료가 요구될 수 있도록 하기 위하여 92년 개정된 산업안전보건법 및 시행세칙 제83조 규정(노동부 1989, 노동부 1992)인 “미생물을 이용한 복귀돌연변이 시험과 포유류 배양세포를 이용한 염색체 이상시험 또는 이와 동등이상의 결과를 얻을 수 있는 시험이나 발암성시험자료를 제출해야한다”는 “차세대독성(유전독성)을 예측할 수 있는 변이원성시험, 발암성을 예측할 수 있는 변이원성시험과 이와 동등 이상의 결과를 얻을 수 있는 시험이나 (2년)발암성시험자료를 제출해야한다” 즉시 개정되어야 함은 물론 시험항목들을 미국의 경우와 같이 정확히 규정할 것을 제안한다. 이와 같은 제안에 따라 하루빨리 노동부고시 제 92-25중 요구되는 시험항목이 개정되어 본 연구원이 신규화학물질 유해성 조사 전문기관으로써 유전독성시험을 체계적으로 원활히 수행할 수 있어야 하겠다.

참 고 문 헌

ACGIH. 1991-1992 Threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological exposure indices. 1991

Adams WGF. Long-term effects on the health of menengaged in the manufacture of tolylene di-isocyanate. Br J Ind Med 32 72-78 1975

Alarie Y. Sensory irritation of the upper airways by airborne chemicals. Toxicol Appl Pharmacol 24 279-297 1973

Amdur MO., Doull J and Klaassen CD. Casarett and Doull's toxicology-The basic science of poisons" 4th ed. 1991

American Chemical Society. 10 million chemical substance registered. Chem Engineering News. Feb 26 1990

Ames BN., Lee FD and Durston WE. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. Proc Natl Acad Sci. 70 782-786 1973

Ames BN., McCann J and Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian microsome mutagenicity test. Mut Res 31 347-64 1975

Anderson D and Styles JA. Appedix II. The bacterial mutation test. Br J Cancer 37 924-930 1978

Anderson M., Binderup ML., Kiel P., Larsen H and Maxild J. Mutagenic action of isocyanates used in the production of polyurethanes. Scan J Work Environ Health 6 221-26 1980

Applegate MI., Moore MM., Brocier CB., Burrell A., Juhn G., Kasweck KL., Liu PF., Wadhams A and Hozier JC. Molecular dissection of mutations at the heterozygous thymidine kinase locus in mouse lymphoma cells, Proc Natl Acad Sci 87 51-55 1990

Arlett CF., and Cole J. The role of mammalian cell mutation assays in mutagenicity and carcinogenicity testing. Mutagenesis. 3, 455-458 1988

Arni P., Ashby J., Castellino S., Engelhardt G., Herbold BA., Priston RAJ and Bontinck WJ. Assessment of the potential germ cell mutagenicity of industrial and plant protection chemicals as part of an integrated study of genotoxicity in vitro and in vivo. Mut Res 203 177-84 1988

Ashby, J. The prospects for a simplified and internationally harmonized approach to the detection of possible human carcinogens and mutagens. Mutagenesis 1 3-16 1986

ATSDR. Toxicological profile for chromium. 1991a

ATSDR. Toxicological profile for 1,4-dichlorobenzene. 1991b

ATSDR(DHHS)/EPA. Guidelines for development of toxicological profile. Fed Reg 52 12870-74 1987a

ATSDR/EPA. Notice of the first priority list of hazardous substances that will be the subject of toxicological profile. Fed Reg 52 12866-70 1987b

ATSDR/EPA. Hazardous substances priority list, toxicological profile: Second list. Fed Reg 53 4128085 1988

ATSDR/EPA. The third list of hazardous substances that will be the subject of toxicological profile. Fed Reg 54 43615-19 1989

ATSDR/EPA. The fourth list of hazardous substances that will be the subject of toxicological profile. Fed Reg 55 42067-71 1990

ATSDR/EPA. The fifth list of hazardous substances that will be the subject of toxicological profile. Fed Reg 56 52166-72 1991a

ATSDR/EPA. Intent to revise the priority list of hazardous substances that will be the subject of toxicological profile. Fed Reg 56 29485-87 1991b

Audunsson G and Mathiasson L. Simultaneous determination of amines and isocyanates in working atmospheres by gasliquidchromatography. J Chromatogr 261 253-264 1983

Auletta A and Ashby J. Meeting Report: Workshop on the relationship between short-term test information and carcinogenicity, willamsburg,

- VA. January 20-23, 1987. Environ Mol Mutagen. 11 135-145 1988
- Baur X and Fruhmann G. Specific IgE antibodies in patients with isocyanate asthma. Chest 80 73-76 1981
- Baur X., Dewair M and Fruhmann G. Detection of immunologically sensitized isocyanate workers by RAST and intracutaneous skin tests. J Clin Immunol 73 610 1983
- Belin L., Wass U., Audunsson G and Mathiasson. Amines: possible causative agents in the development of bronchial hyperreactivity in workers manufacturing polyurethanes from isocyanates. Br J Ind Med 40 251-257 1983
- Berman JS., Wellter PF. Airway eosinophils and lymphocytes in asthma. Am J Respir Dis 145 1246-8 1992
- Bernstein I. Isocyanate-induced pulmonary diseases: a current perspective. J Allergy Clin Immunol 70 25-31 1982
- Brochhagen FK and Grieveson BM. Environmental aspects of isocyanates in water and soil. Cell Polymer 3 11-17 1983
- Brown WE., Green AH., Cedel TE and Cairns J. Biochemistry of protein-isocyanate interaction: A comparison of the effects of aryl vs alkyl isocyanates. Environ health Perspect. 72 5-121 1987
- Brusick D. Genetic toxicology. in "Principles and methods of toxicology. Ravan Press. Hays AW(ed) pp 407-434 1991
- Cartier A., Grammer L., Malo JL., Lagier F., Ghezze H., Harris K and Patterson R. Specific serum antibodies against isocyanates: Association with occupational asthma. J Allergy Clin Immunol. 84 507-14 1989
- Castleman BI and Ziem GE. Corporate influence on threshold limit values. Am J Ind Med 13 531-59 1988
- Chadwick DH and Cleveland TH. Isocyanates, organic. In: Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology, 3rd ed., New York, John Wiley and Sons, Vol. 13, pp789-818 1981
- Cimino MC and Auletta A. Mutagenicity testing guidelines for the USEPA

Office of Toxic Substances. Environ Mol Mutagen. 15(Suppl 17) 13 1990

Cvitanovic S., Zekan LJ and Marusic M. Occurrence and specificity of IgE antibodies to isocyanate in occupationally exposed workers. Int Arch Occup Environ Health 61 483-86 1989

Culleen LE. USEPA's new chemicals program into the 1990's: Talking points. MITI Conference Tokyo 1991

Dearfield KL. Potential EPA/OPP mutagenicity testing requirements-guidelines revisions. Environ Mol Mutagen 14(suppl.15) 47 1989

Dearfield KL., Auletta AE., Cimino MC and Moore MM. Considerations in the USEPS's testing approach for mutagenecity. Mut Res 258 259-83 1991

Descartes DM. Autoimmune diseases and toxicology. Dekker Press. 1986

Ennever FK and Rosenkranz HS. The influence of the proportion of carcinogens on the cost effectiveness of short term tests. Mut Res 197 1-13 1988

Environ Co. Elements of toxicology and chemical risk assessment. Revised ed 1988

Finotto S., Fabbri LM., Rado V., Mapp CE and Maesrelli P. Increase in numbers of CD8 positive lymphocytes and eosinophils in peripheral blood of subjects with late asthmatic reactions induced by toluene diisocyanate. Br J Ind Med 48 116-21 1991

Fox M. The case for retention of mammalian cell mutagenicity assays. Mutagenesis 3 459-461 1988

Hardy HL and Purnell CJ. Use of foam for the emergency suppression of vapour emissions from organic isocyanate liquid surfaces. Ann Occup Hyg 21 95-98 1978

Hays AW. Principles and methods of toxicology. Ravan Press. 1991

Hoffmann GR. Genetic toxicology. in "Casarett and Doull's toxicology-The basic science of poisons" 4th ed. pp 201-25. 1991

Holdren MW., Spicer CW and Riggin RM. Gas phase reaction of toluene

- diisocyanate with water vapor. Am Ind Hyg Assoc J. 45 626-33 1984
- IPCS. Guide to short term tests for detecting mutagenic and carcinogenic chemicals. Environ Health Criteria vol 51 1985
- IPCS. Toluene diisocyanate. Environ Health Criteria. Vol 75. 1987a
- IPCS. Diaminotoluene. Environ Health Criteria. Vol 74. 1987b
- IPCS. Summary report on the evaluation of short term tests for carcinogens (Collaborative study on in vivo test). Environ Health Criteria. vol 109 1990
- IRPTC. Toluene diisocyanate. IRPTC Bulletin. 9(1). 34-35. 1989
- Karol MH and Jin R. Mechanisms of immunotoxicity to isocyanates. Chem Res Toxicol 4 503-9 1991
- Kazama Y. Directions and experiences in the registration of chemicals in Japan. JETOC News Letter 8 3-22 1991
- Kier LD. Comments and perspective on the EPA workshop on "The relationship between short term test information and carcinogenicity". Environ Mol Mutagen 11 147-57 1988
- Kier LD., Brusich DJ., Auletta AE., von Halle ES, Brown MM., Simmon VF., Dunkel V., McCann J., Mortelmans K., Prival M., Rao TK and Ray V. The salmonella typhimurium mammalian microsomal assay. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mut Res 168-210 1986
- Kolber AR., Wong TK., Grant LD., De Woskin RS and Hughes TJ. In vitro toxicity testing of environmental agents. Part A and B. Plenum Press. 1983
- Lave LB and Omenn GS. Cost effectiveness short-term tests for carcinogenicity. Nature(London) 321 29-34 1986
- Legator MS and Harper BL. Mutagenicity screening in vitro testing-the end of an era; animal and human studies the direction for the future, in: C. Maltoni and L.J. Selikoff(Eds.), Living in a Chemical World, Occupational and Environmental Significance of Industrial Carcinogens.

Ann NY Acad Sci. 534 833-844 1988

Loeser E. Long-term toxicity and carcinogenicity studies with 2,4/2,6-toluene-diisocyanate(80/20) in rats and mice. Toxicol Letter 15 71-81 1983

Maeki-Paakkanen J and Norpa H. Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges induced by technical grade TDI and MDI in cultured human lymphocytes. Toxicol Letter 36 37-43 1987

Maron DM and Ames BN. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mut Res 113 173-215 1983

Mavournin KH., Blakey DH., Salamone MF and Heddle JA. The in vivo bone marrow micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene Tox Program. Mut Res 239 29-80 1990

Merrill RA. Regulatory toxicology. in "Casarett and Doull's toxicology- The basic science of poisons" 4th ed. pp 970-84. 1991

Moore MM., Harrington-Brock K., Doerr CL and Dearfield KL. Differential mutant quantitation at the mouse lymphoma tk and CHO hgprt loci. Mutagenesis 4 394-403 1989

NAS/NRC. Risk assessment in the Federal Government: Managing the Process. Washington DC. National Academic Press. 1983

NAS. Identifying and estimating the genetic impact of chemical mutagens. Washington DC, Academic Press. 1982).

NIOSH. Criteria for a recommended standard occupational exposure to diisocyanates, Rockville, Maryland, US National Institute for Occupational Safety and Health(NIOSH 78-215:PB 81-226615). 1978

NTP. Disposition of 2,6-TDI in F344 rats. Research Triangle Park, North Carolina, US National Toxicology Program(Project Report No. 7; Contract No N01-ES-1-5007, RTI/2227/00-06P) 1985

NTP. Toxicology and carcinogenesis studies of commercial grade 2,4(80%)- and 2,6(20%)-toluene diisocyanate(CAS No. 26471-62-5) in F344/N rats and B6C3F1 mice(gavage studies), Research Triangle Park, North Carolina, US

National Toxicology Program(Technical Report No. 251;NIH Publication No. 86-2507) 1986

NTP. Review of current DHHS, DOE and EPA research related to toxicology. Fiscal year 1991. US Public Health Service. 1991a

NTP. National toxicology program. Fiscal year 1991. US Public Health Service. 1991b

OECD. Data interpretation guides for initial hazard assessment of chemicals; Provisional. 1984

OECD. OECD Guidelines for testing of chemicals. 1981, 1984, 1987

Ong T., Stewart J., Whong WZ and Boeniger M. Mutagenic assessment of airborne particles from three polyurethane foam manufacturing facilities. Am J Ind Med 11 475-83 1987

OSHA. Air contaminants(29 CFR Part 1910): Final rule. Fed Reg 54 2332-2983. 1989

Oshima T. Recent overseas trends of risk assessment and risk management of chemical substances. 日本 Risk 研究學會誌 3 1-10 1991

Pollock JRA and Stevens R. Dictionary of organic compounds. 4th ed. New York, Oxford University Press. Suppl. 10, p.337. 1974

Purchase LFH., Longstuff F., Ashby J., Styles JA., Anderson D., Lefebvre PA and Westwood FR. An evaluation of 6 short term tests for detecting organic chemical carcinogen. Br J Cancer 37 837-959 1978

Robinson JC., Paxman DG and Rappaport SM. Implications of OSHA's reliance on TLVs in developing the air contaminants standard. Am J Ind Med 19 3-13 1991

Scala RA. Risk assessment. in "Casarett and Doull's toxicology-The basic science of poisons" 4th ed. pp 985-996. 1991

Skarping G., Brorson T and Sango C. Biological monitoring of isocyanates and related amine. III. Test chamber exposure of human to TDI. Int Arch Occup Environ Health. 63 83-88 1991

Slatter JG., Rashed MS., Pearson PG., Han DH and Baillie TA. Biotransformation of methyl isocyanate in the rat. Evidence for glutathione conjugation as a major pathway of metabolism and implications for isocyanate mediated toxicities. Chem Res Toxicol. 4 157-61 1991

Styles JA. Appendix III. Mammalian cell transformation in vitro. Br J Cancer 37 931-936 1978

Tennant RW., Margolin BH., Shelby MD., Zeiger B., Haseman JK., Spalding J., Caspary W., Resnick M., Stasiewicz S., Anderson B and Minor R. Prediction of chemical carcinogenicity in rodents from in vitro genetic toxicity assays. Science 236 933-41 1987

UN. ACCIS guide to UN information sources on the environment. 1988

UN. Preparations for the UN conference on environment and development on the basis of general assembly resolution 44/228 and taking into account other relevant general assembly resolutions: Cross sectional issue: Environmentally sound management of toxic chemicals including prevention of illegal international traffic in toxic and dangerous products. Section II Chap 11 of Agenda 21 1992

UNEP. Montreal protocol on substances that deplete the ozone layer. 1987

UNEP. Exchange of information on chemicals in international trade: time for action. IRPTC Bulletin. 9(1) 1-2 1988a

UNEP. London guidelines for the exchange of information on chemicals in international trade. IRPTC Bulletin 9(1) 3-4 1988b

UNEP. Prior informed consent: a major breakthrough. IRPTC Bulletin. 9(2) 1-2 1989a

UNEP. Montreal protocol on the ozone layer. IRPTC Bulletin 9(2) 4-5 1989b

UNEP. London guideline-prior informed consent. IRPTC Bulletin 10(2) 4-6 1991

UNEP/FAO. Operation of the prior informed consent procedure for banned or severely restricted chemicals in international trade: Guidance for governments. 1991

USEPA. Toxic substance control act. 1983

USEPA. Guidelines for carcinogen risk assessment. Fed Reg 51 33999-34003 1986a

USEPA. Guidelines for mutagenecity risk assessment. Fed Reg 51 34006-12 1986b

USEPA. Guidelines for the health risk assessment of chemical mixtures. Fed Reg 51 34014-25 1986c

USEPA. Guidelines for the health assessment of suspect developmental toxicants. Fed Reg 51 34028-40 1986d

USEPA. Guidelines for estimating exposures. Fed Reg 51 34042-54 1986e

USEPA. Revision of TSCA test guidelines. Fed Reg 51. 1522-41. 1986f

USEPA. Revision of TSCA test guidelines. Fed Reg 52. 19078-81 1987

USEPA. Proposed guidelines for assessing female reproductive risk. Fed Reg 53 24834-47 1988a

USEPA. Proposed guidelines for assessing male reproductive risk. Fed Reg 53 24850-69 1988b

USEPA. Intent to review guidelines for carcinogenic risk assessment. Fed Reg 53 32656-58 1988c

USEPA. Testing consent order on alkyl phthalates. Fed Reg 54 618-21 1989a

USEPA. Premanufacture Notification. CFR 40 chap 1 Part 720 1989b

USEPA. Significant new uses of certain chemical substances. Fed Reg 56 19228-42 1991

USEPA. Guidelines for exposure assessment. Fed Reg 57 22888-99 1992

USITC. Preliminary report on US production of selected synthetic organic chemicals. Imports, exports and sales, Washington DC. US international Trade Commission 1985

Warwick C.J., Bagon DA and Purnell C.J. Application of electrochemical detection to the measurement of free monomeric aromatic and aliphatic isocyanates in air by high-performance liquid chromatography. Analyst 106 676-685 1981.

경제기획원 지구환경대책기획단. 21세기 지구환경 실천 강령. 1992

김 옹화. 화학물질의 안전성 시험. 환경처 1988

노동부. 유해물질의 허용농도. 노동부고시 91-21호. 1991

노동부. 신규화학물질의 유해성 조사 및 심사기준안. 노동부고시 92-25. 1992

労働省化学物質調査課. 安衛法における 變異原性試験-Test guideline and GLP. 中央労働災害防止協會. 1991

목 명수. 한국에 있어서 산업독성 연구과제- 유해물질의 허용농도설정의 기초 자료 마련을 위하여. 안전보건. 4(11). 87-101. 1992a

목 명수 외 7인. 유독물질관리실무. 환경처. 환경공무원교육원. 1992b

오 세민., 맹 승희. 화학물질의 유해성 평가 시스템 개발에 관한 연구-변이원성 평가를 중심으로. 산업보건연구원 보고서. 독성연구자료. 독성 92-1-1. 1992

유독물질관리협회. 화학물질 유해성심사 실무. 1992

日本労働省安全衛生部 化学物質調査課 編. 労働安全衛生法. 有害性調査制度解説. 中央労働災害防止協會, 1990

日本化学物質安全情報 Center. 米國 TSCAの 製造前 届出: 規則と解説. 1990

日本化学物質委員會. 國內と國外における化学物質 規制 カイト. 1991

竹中 祐典. 毒性情報の検索と管理. 毒性試験講座 2. 地人書店(日本) 1989

渡邊 徹, 堀内茂友. 毒性試験法 カイトライン, GLP基準. 毒性試験講座 3. 地人書店(日本) 1989

石官 基. 變異原性, 遺傳毒性. 毒性試験講座 12. 地人書店(日本) 1991

堀内茂友. 發がん性. 毒性試験講座 13. 地人書店(日本) 1989

化審法：毒性試験法 解説. 日本化学工業日報社 1992

환경처. 화학물질 신고서 및 자료의 작성 방법등에 관한 고시. 환경처고시 91-13호. 1991

환경처. 화학물질 유통조사집(1). 1990

이소시아네이트 화합물의
변이원성비교연구
(92 - 2 - 13)

발 행 일 : 1992.12
발 행 인 : 정 규 철
발 행 처 : 한국산업안전공단 산업보건연구원
 인천직할시 북구 구산동 34 - 3
 전 화 : (032) 518-0861
인 쇄 인 : 김 재 극
인 쇄 처 : 문 원 사

<비매품>