

연구자료

독성96-2-14

# 비변이원성 물질의 발암성예측에 관한 연구

— 2-bromopropane에 의한 간세포에서의 소핵유발 —

1996



한국산업안전공단  
산업보건연구원

## 제 출 문

한국산업안전공단 이사장 귀하

본 연구결과를 1996년도 산업보건연구원의 연구사업중 “비변이원성 물질의 발암성예측에 관한 연구”에 대한 최종결과보고서로 제출합니다.

1996년 12월 31일

제출자: 산업보건연구원장 문 영한

연구책임자: 선임연구원 맹 승희

공동연구자: 책임연구원 유 일재

기술직 4급 이 준연

---

# 목 차

|                                            |    |
|--------------------------------------------|----|
| Abstract.....                              | 1  |
| I. 서론.....                                 | 3  |
| 1. 연구배경.....                               | 3  |
| 1) Ames 시험에 있어서 민감도의 저하.....               | 4  |
| 2) In vitro 염색체이상시험과 골수 소핵시험의 특이도의 저하..... | 6  |
| 3) 설치류 골수세포를 이용한 소핵시험의 문제점.....            | 6  |
| 4) Halogenated propane의 변이원성.....          | 10 |
| 2. 연구목적.....                               | 12 |
| II. 연구방법.....                              | 13 |
| 1. 시약.....                                 | 13 |
| 2. 사용동물.....                               | 13 |
| 3. 실험방법.....                               | 14 |
| 1) 간세포를 이용한 소핵시험.....                      | 14 |
| 2) 골수세포를 이용한 소핵시험.....                     | 17 |
| 4. 통계처리.....                               | 18 |
| III. 연구결과.....                             | 19 |
| 1. 간세포에서의 소핵시험.....                        | 19 |
| 1) 동물관찰소견.....                             | 21 |
| 2) 간세포에서의 소핵유발.....                        | 23 |
| 2. 골수세포에서의 소핵시험.....                       | 23 |
| 1) 동물관찰소견.....                             | 23 |
| 2) 골수세포에서의 소핵유발.....                       | 27 |
| IV. 고찰.....                                | 27 |
| V. 결론 및 요약.....                            | 32 |
| VI. 참고문헌.....                              | 35 |

---

## 표 목 차

- Table 1. Positive sensitivity and negative specificity to carcinogens and noncarcinogens on Ames test
- Table 2. Target organs of micronucleus test negative carcinogens
- Table 3. The relationship between results of micronucleus test and target organs in IARC carcinogens
- Table 4. The relationship between in vitro and in vivo mutagenic tests
- Table 5. The composition of the perfusion solutions
- Table 6. The changes of body weight of rats during experiments
- Table 7. Frequency of micronucleated hepatocytes in partially hepatectomized rat liver after intraperitoneally injected twice with 2BP
- Table 8. The body weights of male rats before and after 28 day treatment
- Table 9. The body weights of female rats before after 28 day treatment
- Table 10. Results of the bone marrow micronucleus assay by repeated intraperitoneal injection with 2BP for 28 days

## 그림 목 차

Fig. 1. Distribution of carcinogens in considering non-mutagenic carcinogens.

Fig. 2. The Experimental schedule for rat liver micronucleus assays

Fig. 3. The changes of body weight of rats before and after hepatectomy

Fig. 4. Frequencies of micronucleated hepatocytes in partially hepatectomized rat liver after intraperitoneally injected twice with 2BP

Fig. 5. The changes of body weight of rats before and after 28 day treatment of 2BP

# **A Study on Carcinogenicity of Non-mutagenic Chemicals**

## **-The Induction of Micronucleus in Hepatocytes of Rats by 2-Bromopropane-**

Seung Hee Maeng, Jun-Yeon Lee, and Il Je Yu

Department of Industrial Toxicology, Industrial Health Research Institute, KISCO,  
34-6, Kusan-dong, Bupyeong-gu, Incheon 403-120, Korea

### **-Abstract-**

The mutagenicity of 2-Bromopropane was rescreened through the micronucleus assay both in hepatectomized rat liver cells and bone marrow cells, which had shown no mutagenicity in the previous study using in vitro chromosomal aberration analysis and in vivo micronucleus assay in 14 day repeated dose experiment.

In addition, the availability of hepatocyte micronucleus assay for non-mutagenic chemicals in the mutagenic tests suggested in general regulatory guidelines, such as OECD guideline, was evaluated at the point of view that it could substitute or compensate the existed mutagenic test methods for carcinogenicity.

The mean frequencies of MNHs (micronucleated hepatocytes) induced by 2BP at the concentrations of 200, 400, 800 and 1,600 mg/kg b.w. were  $0.53 \pm 0.20\%$ ,  $0.57 \pm 0.14\%$ ,  $0.53 \pm 0.15\%$ , and  $0.58 \pm 0.22\%$  respectively while the control group shows the frequency of  $0.22 \pm 0.08\%$ ; There were significant increases in micronucleus induction in treatment groups compared with control group ( $p < 0.05$ ).

The mean frequencies of MNPCEs (micronucleus in polychromatic erythrocytes) induced by 28 day i.p. repeated dose experiment were  $0.19 \pm$

0.41%,  $0.18 \pm 0.10\%$ , and  $0.21 \pm 0.1\%$  at the concentrations of 125 mg/kg b.w., 250 mg/kg b.w. and 500 mg/kg b.w. respectively. There was no increase of frequency compared with a control group ( $0.15 \pm 0.15\%$ ).

From these results, the clastogenicity of 2BP could be confirmed only through the rat liver micronucleus assay. Therefore the carcinogenicity of halogenated compounds including 2BP, of which mutagenicity was uncertain with non-clastogenic results from in vitro chromosome aberration analysis and bone marrow micronucleus, could be predicted by clastogenicity in hepatocytes with the positive results of mutagenicity in *Salmonella typhimurium*.

# 비변이원성 물질의 발암성 예측에 관한 연구 -2-Bromopropane에 의한 간세포에서의 소핵유발-

맹 승희, 이 준연, 유 일재

한국산업안전공단 산업보건연구원 산업독성연구실  
인천광역시 부평구 구산동 34-6, 403-120

## I. 서 론

### 1. 연구배경

OECD를 비롯한 FDA, EEC등에서 화학물질을 관리하기 위해 출판되어 있는 각종 화학물질의 독성시험 가이드라인, 세계 각 국가에서 생산, 수입하는 식품, 의약품 등을 포함한 화학물질에 대한 독성중 변이원성에 대한 검사규정에 흔히 도입되어 있는 것은 유전자돌연변이 시험법 1방법, 염색체이상에 대한 시험 1방법 및 DNA에의 영향시험 1방법등이 제시되고 있는 점이 공통적이다. 이들 규제시험방법 가이드라인에 반드시 제시되어 있는 것으로서 가장 전통적이며 대표적인 변이원성 시험이라 할 수 있는 것이 미생물을 이용한 복귀돌연변이 즉 Ames 시험과, 포유류 세포에서의 in vivo 및 in vitro의 염색체이상시험이라 할 수 있다.

화학물질의 발암성의 조기 시험방법으로서 이들 Ames 시험을 비롯한 각종 변이원성시험이 20여년간 행하여지고 있으나 근래에 이룰수록 이들 시험결과와 발암성 시험결과와의 적합성이 종종 문제가 되고 있다. 이 문제점을 요약하면 변이원성을 나타내되 발암성을 갖지 않는 변이, 비발암성물질이 있다는 점과 또한 반대로 변이원성을 나타내지 않되 발암성이 있는 소위 비변이, 발암성물질이 존재한다는 점이다. 이 두가지를 인간에의 외삽이라는 관점에서 생각했을 경우 현행의 동물이나 세



포를 이용한 발암성 시험과 변이원성 시험은 각각 중요하지만 본질적 그리고 합리적으로 생각할 때 사람에게서의 발암성 물질을 정확하게 포착해낼 수 있어야 한다.

현재까지 발암성물질의 조기 검출법으로서 각종 변이원성 시험을 국제적으로 평가된 결과, 미국의 NTP (National Toxicology Program)과 FDA의 조사에 따르면 변이원성 시험에 있어 발암성물질의 양성검출율 즉 민감도는 Ames시험이 약 50%, 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험이 약 55%, 골수세포를 이용한 소핵시험의 경우 91%를 나타내었고, 역으로 비발암성물질을 음성으로 나타내는 음성검출율 즉 특이도는 Ames시험이 90%, 염색체이상시험이 65% 그리고 소핵시험이 13%이었다 (Uno et al., 1992; Yoshikawa, 1993; Zeiger et al., 1990). 이와 같은 사실은 민감도가 낮은 시험은 비변이, 발암물질의 결과를 나타내는 원인을 제공하고 또한 특이도가 낮으면 결국 위양성 (false positive)이 높은 시험법은 변이, 비발암성물질의 결과를 부여하는 원인이 되는 것을 시사하고 있다.

최근 민감도가 낮아졌다고 여겨진 Ames 시험은 다른 변이원성시험과 비교하여 특히 비판을 받았으나 최근 각 시험의 신뢰성 즉 민감도와 특이도를 동시에 평가한 값으로 보면 Ames시험의 신뢰성이 70%로 가장 높으며 염색체이상시험이 60% 그리고 소핵시험이 52%로 가장 낮게 나타났다 (Uno, et al., 1992). 각각의 시험법에서의 신뢰성에 대한 견해를 요약해 보면 다음과 같다.

#### 1) Ames 시험에 있어서 민감도의 저하

현재까지 보고된 Ames시험의 대표적인 예는 Table 1과 같다. Ames 시험은 1975년경에는 발암성물질에 대한 민감도 및 비발암성물질에 대한 특이도가 각각 90%정도를 나타내었었다 (McCann et al., 1975; Sugimura et al., 1976; Purchase et al., 1976). 그러나 최근에 이르러 Ames시험의 특이도는 같은 수준이지만 민감도는 50%정도로 보고되고 있다(Tennant et al., 1987; Zeiger et al., 1990). 이러한 원인은 시험에 사용했던 화학물질들의 차이임이 명확한데 즉 높은 민감도를 나타내는 물질은 다환상 방향족 탄화수소, N-니트로조 화합물류, 방향족 아민류등 강한 발암성 물질로 동물의 암수 구별없이 발암성을 유발하는 것이 많이 포함되어 있다.

한편 낮은 민감도를 나타내는 것은 할로젠 유기화합물류, peroxisome증식물질 등의 약한 발암성 물질로 동물의 암수에 따라 발암성을 유발시키는 양상이 다른 물질을 많이 포함하고 있다. 예를 들면 할로젠 유기화합물질에서 흔히 그렇듯이 마우스 간장만을 표적장기로 하는 발암물질과 peroxisome 증식을 동반하는 발암물질은 Ames시험에서 양성으로 검출되지 않는다. 결국 Ames시험 음성의 발암성 물질의 대부분은 생체내에서 직, 간접적으로 활성효소를 발생시키는 것임이 추정되었다 (Uno et. al., 1992).

Ames시험에 있어서 1975년 당사와 최근에 있어서의 민감도의 차이는 연구대상물질이 갖는 발암성의 특징때문인 것 같다. 대상물질 선택시의 차이란 고의적인 것은 아니나 위에서 언급한 할로젠 유기화합물과 peroxisome증식물질과 같은 발암물질은 1975년이전에는 NTP등에서 아직 명확한 데이터가 없어 대상물질이 되지 못했던 것이다.

Table 1. Positive sensitivity and negative specificity to carcinogens and noncarcinogens on Ames test. (Uno et al., 1993)

| Author          | Positive Sensitivity(%) | Negative Specificity(%) |
|-----------------|-------------------------|-------------------------|
| McCann (1975)   | 90(157/175)             | 87(94/108)              |
| Sugimura (1978) | 85(136/160)             | 74(60/81)               |
| Purchase (1978) | 91(53/58)               | 97(60/62)               |
| Tennant (1987)  | 45(20/44)               | 86(25/29)               |
| Zeiger (1990)   | 52(12/23)               | 100(18/18)              |

Yoshioka (1993) 및 Uno et al.(1992)은 Ames시험의 민감도가 약 50%인 점을 해석할 때 다음과 같이 하였다. 먼저 그는 기존의 발암성물질은 initiation활성 (I)을

주로 하는 것에서 부터 발암 promotion (P)를 주로 하는 것 까지 여러 가지 구성비가 존재하는 것으로 가정하여 (Fig. 1.), 환경중의 발암물질의 분포상황은 Fig. 1.의 중앙에 나타낸 발암 initiation활성과 발암promotion 활성을 반반씩 갖는 발암물질을 정점으로 하는 정규분포를 그릴 것으로 가정하였다. 이때 발암 initiation활성을 갖는 비율이 높은 발암물질은 그만큼 Ames 시험에서 양성으로 되고 발암 promotion 활성을 갖는 비율이 높은 발암물질은 Ames 시험에서 음성으로 될 것으로 볼 때 기존의 발암성 물질중 반정도가 Ames 시험에서 음성으로 되는 것을 납득하였다. 따라서 이들은 Ames 시험에서 음성을 나타내는 비변이, 발암성 물질은 발암 promotion활성이 발암원인의 대부분을 차지하는 발암물질일 것으로 생각하였다. 즉 미지의 화학물질일 경우 먼저 Ames 시험에서 발암 initiation활성을 조사하고 음성인 경우 발암 promotion 활성을 조사하는 어떤 시험방법이 필요함을 제시하였다.

## 2) In vitro 염색체이상시험과 골수 소핵시험의 특이도의 저하

염색체 이상 및 소핵시험은 지금까지 Ames 시험 음성의 발암성 물질을 양성으로 하는 것에 주안점을 두어 비발암성물질이 이 두 시험법에 어떻게 결과를 나타내는 가 하는 것은 충분히 파악되지 않은 채 각 국의 규제시험이 되어왔다. 위에서도 언급했듯이 최근에 이르러 염색체이상과 소핵시험에 있어서 특히 특이도가 낮음이 보고되었는데 이러한 특이도의 저하는 각 기업의 신규화학물질의 탐색초기단계에 심각한 문제를 주고 있다. 특히 염색체이상시험의 위양성(false positivity)이 혼란 원인이 되어 변이원성시험과 화학합성 담당자간의 불신감이 생기게 되고 신규화학물질의 염색체이상이 양성으로 판정되었다라도 그 개발추진의 시비를 판단하기 어렵게 하는 상황이 되고 있다.

## 3) 설치류 골수세포를 이용한 소핵시험의 문제점

소핵시험은 마우스 등의 설치류 실험동물을 화학물질에 폭로시켰을 때 유발된 염색체이상을 골수의 다염성 적혈구중에 관찰되는 소핵으로 검출하는 시험법이다.

이 시험은 주로 골수세포를 사용하여 실시하고 있는데 생체내 실험(in vivo)으로 화학물질의 염색체이상 유발성을 조사하는 시험으로서 세계에서 가장 널리 실시되고 있다. 즉 이 시험법은 Ames 시험, 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상과 함께 많은 국가의 필수적인 규제시험의 하나로 되어 최근에 이르러 국제적으로 이 시험법에 대한 관심이 증대되고 있다.

규제시험으로 채택되어 있는 마우스 골수 소핵시험의 주요 특징은 첫째, 생체내(in vivo) 시험이라는 점과 둘째, 조혈세포(적혈구)에서 염색체이상을 관찰한다는 점이다. 첫째의 생체내 시험이라는 특징은 매우 중요한데 일본, 우리나라등에서 채택하는 변이원성시험중 유일한 생체내 시험이라는 것 때문이다. 일반적으로 이용되고 있는 in vivo의 변이원성 시험에는 마우스 소핵시험이외에도 마우스, 흰쥐의 골수세포를 이용한 염색체이상시험, 간장 등을 이용한 in vivo 부정기 DNA (UDS) 합성 시험, 또는 우성치사시험등 몇가지가 있으나 일상적으로 in vivo의 변이원성시험을 실시할 경우 소핵시험을 가장 많이 채택하고 있다. 그러나 위에서도 언급했듯이 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험은 특이도가 특히 낮아 위양성(false positive)의 문제가 있으므로 여러 규제 가이드라인에서 이 시험법에 대한 융통성이 필요시 되고 있다.

둘째의 특징인 골수내에서 유발시킨 염색체이상을 다염성 적혈구중의 소핵으로 관찰한다는 점에서 소핵시험은 매우 간편하고 정량적인 시험법이며, 또한 핵이 없는 다염성 적혈구에서 소핵을 관찰하는 것은 판별이 쉽고 염색체를 관찰하는 것보다 관찰자의 숙련도를 요하지 않는다. 또한 다염성 적혈구를 관찰하는 것은 화학물질이 작용하는 동안의 변화를 정량적으로 파악할 수 있어 이러한 이점에서 소핵시험이 보급되었고 최고로 많이 실시되고 있는 생체내 시험이 되었다. 최근에는 골수뿐만 아니라 말초혈액의 적혈구중 소핵을 관찰하는 방법이 실시되고 있으나(Mavournin et al., 1990; CSGMT, 1992) 이것 또한 적혈구를 관찰하는 것이므로 조혈세포내의 염색체이상을 관찰하는 점은 마찬가지이다.

발암물질에는 장기특이성이 있는 것으로 알려져 있다(Benigni, 1990; Tomatis and Bartsch, 1990; Tennant and Ashby, 1991). 마찬가지로 화학물질의 작용 또한 장기특이성이 있을 것을 감안할 때 적혈구에 생긴 염색체이상만을 관찰하는 소핵시

험만으로 생체 내에서의 화학물질의 활성을 파악할 수는 없음이 명백하다. 국제암 연구소 (IARC)에 의해 사람에 대한 발암물질로 정해진 물질중 마우스 골수 소핵시험의 결과 음성이었던 물질의 발암부위를 조사해 보았는데 (Benigni, 1990; Tomatis and Bartsch, 1990; Tennant and Ashby, 1991) 간장에 특이적으로 암을 일으키는 물질중 골수를 이용한 소핵시험으로 검출할 수 없는 물질이 많았다 (Table 2). 또 드물지만 폐에 특이적인 화합물중에도 소핵시험으로 검출할 수 없는 물질들이 있었다.

IARC 발암물질의 발암표적부위와 소핵시험과의 관계를 보면 (Table 3), 특히 조혈조직, 국소부위 또는 간장에 대해서 그 결과를 보면, 당연한 결과이겠지만 골수가 대표적인 조혈조직이 표적장기인 발암물질에서는 80% 이상이 소핵시험에서 양성 결과이었다. 그러나 투여부위 또는 피부의 도포부위 등의 국소부위가 표적장기인 발암물질에서는 민감도가 50%, 간장이 표적장기인 발암물질에서는 45%인 결과를 나타내었다.

Table 2. Target organs of micronucleus test negative carcinogens (Wakada, et al., 1993)

| Organs               | Chemicals                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Liver                | Benzo[ <i>a</i> ]anthracene, Vinyl bromide, Auramine, Carbone tetrachloride, <i>p</i> -Cresidine, 2,4-Diaminotoluene Di(2-ethylhexyl)phthalate, 1,4-Dioxan, Hexachlorocyclohexans, 4,4'-Methylenedianilin, N-Nitrosodi- <i>n</i> -butylamine, N-Nitrosopiperidine, N-Nitrosodi- <i>n</i> -propylamine, N-Nitrosopiperidine, N-Nitrosopyrrolidine, Phenazopyridine, Phenytoin, Trypan blue, Hexachlorocyclohexans, 5-Nitroacenaphtene |
| Esophagus            | N-nitrosodi- <i>n</i> -butylamine, N-Nitroso- <i>n</i> -propylamine, N-Nitroxopiperidine                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| Stomach              | Acrylonitrile, Ethylene dibromide, Styrene oxide, $\beta$ -butyrolactone                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| Intestine            | Phenazopyridine                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Lung                 | Benzo[ <i>a</i> ]anthracene, Ethylene dibromide, Formaldehyde, Beryllium compounds, 4,4'-Methylenedianiline, Metronidazole, 1,1-Dimethylhydrazine, 5-Nitroacenaphtene                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Skin                 | Benzo[ <i>a</i> ]anthracene, Epichlorohydrin, Ethylene oxide, Styrene oxide, $\beta$ -Butyrolactone, 2,4-Diaminoanisole, 5-Nitroacenaphtene                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Mammary gland        | Acrylonitrile, 2,4-Diaminotoluene, Metronidazole, 3,4'-Dimethylbenzene, 5-Nitroacenaphtene                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Kidney               | <i>o</i> -Anisidine, Lead compounds                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Bladder              | <i>o</i> -Anisidine, <i>p</i> -Cresidine, N-Nitrosodi- <i>n</i> -buthylamine                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Thyroid gland        | Acrylamide, <i>o</i> -Anisidine, Methylthiouracil, 2,4-Diaminoanisole                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Zymbal's gland       | Vinyl bromide, 2,4-Diaminoanisole                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| Adrenal gland        | Acrylamide                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Hormonal organ       | Medroxyprogesterone acetate                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Uterus               | Testosterone                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Brain                | Acrylonitrile                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| Hematopoietic system | chloramphenicol, Cyclosporin, 2,4-Diaminotoluene, Dichloromethane, 4,4'-Methylenedianiline                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |

Table 3. The relationship between results of micronucleus test and target organs in IARC carcinogens (No. of compounds, Wakada, et al., 1993)

| MN test  | Target organ         |              |       |
|----------|----------------------|--------------|-------|
|          | Hematopoietic tissue | Local region | Liver |
| Positive | 23                   | 14           | 19    |
| Negative | 5                    | 13           | 23    |

위의 사실로 발암물질의 표적장기에 따라 소핵시험의 신뢰성이 크게 다를 수 있는데 이중에서도 발암에 관련하여 주요하다고 할 수 있는 간발암물질의 검출력이 낮은 것은 이 시험방법의 큰 문제점이라고 생각된다.

in vitro에서 변이원성을 나타내는 발암물질에 대해 마우스 소핵시험과 간장에서의 UDS시험의 결과 (Ashby, 1986)를 비교해 보면, 두 시험 모두에서 양성을 나타내는 물질도 있으나 소핵시험 또는 UDS시험 어느 하나에만 양성을 나타내는 물질도 많음을 알 수 있다 (Table 4). 이와같이 in vivo의 시험에서는 관찰하는 장기에 따라 물질의 반응성이 확연히 다르므로 골수를 이용한 소핵시험만으로 그 물질의 생체 내에서의 활성을 판단하는 것은 문제가 많다 할 수 있다.

#### 4) Halogenated propane의 변이원성

일련의 halogenated propane에 대한 Salmonella typhymurium TA100을 이용한 복귀돌연변이시험결과에 따르면 2-bromopropane (2BP), 1,2,3-tribromopropane, 1,2-dibromo-3-chloropropane(DBCP), 1,3-dibromo-2-chloropropane의 경우 대사활성화를 포함하는 경우 변이원성을 나타내고 DBCP 및 2BP의 경우는 TA 1535에서도 변이원성을 보여 주고 있다 (Lag et al., 1994, Maeng and Yu, 1995)

세포유전학적 연구결과에 의하면 DBCP는 in vivo 및 in vitro의 염색체이상시험

Table 4. The relationship between in vitro and in vivo mutagenic tests  
(Ashby, 1986)

| Chemicals               | Activity<br>in vitro | Mouse MN assay | Liver UDS | Carcinogenicity |
|-------------------------|----------------------|----------------|-----------|-----------------|
| Dimethylnitrosamine     | +                    | +              | +         | +               |
| Diethylnitrosamine      | +                    | -              | +         | +               |
| 2,4-Dinitrotoluene      | +                    | -              | +         | +               |
| 3'-MeDAB                | +                    | -              | +         | +               |
| 6BT (DAB analogue)      | +                    | -              | +         | +               |
| Dimethylhydrazine       | +                    | +              | +         | +               |
| Cyclophosphamide        | +                    | +              | -         | +               |
| Benzo[a]pyrene          | +                    | +              | -         | +               |
| Hexamethylphosphoramide | +                    | +              | -         | +               |
| Dimethylbenzanthracene  | +                    | +              | -         | +               |
| 2-Acethylaminofluorene  | +                    | +              | +         | +               |
| Benzidine               | +                    | +              | +         | +               |
| MNNG                    | +                    | +              | -         | +               |

+, positive; -, negative

과 자매염색체교환에서 양성의 결과를 보였고 2BP의 경우 in vitro의 염색체이상 및 골수를 이용한 소핵시험에서 음성의 결과가 있었다 (Maeng and Yu, 1995). 또한 1,2,3-trichloropropane을 제외한 3-C hydrocarbon들은 자매염색체 교환에 강한 양성의 결과가 있으며 1-bromopropane, 1,2-dibromopropane 및 1,2,3-tribromopropane 에 대한 세포유전학적 세포유전학적 연구는 드물었다.



2BP는 최근 L 전자회사에서의 집단중독사고 이후 다양하게 역학 및 독성학적 연구가 이루어졌는데 박 등(1995)에 의한 역학연구결과 이 물질이 근로자들의 생식기능저하의 원인물질임을 추정한 바 있고, 실험동물에서도 생식독성연구가 이루어져 암, 수 흰쥐에 있어 생식독성이 있는 물질임이 알려졌다 (Yu et al., 1996). 2BP에 대한 변이원성은 Salmonella 균주 TA 100과 TA1535에서 양성의 결과가 있었고 세포유전학적으로는 음성의 결과가 있었다 (Maeng & Yu, 1995).

## 2. 연구목적

앞에서 언급한 것과 같이 설치류 골수세포에서의 소핵시험결과는 생체내의 화학물질의 변이원 활성을 전부 반영한다고 하기에는 무리가 있다고 사료된다. 그러므로 *in vitro*의 염색체이상시험에서 양성이었던 물질에 대해 소핵시험에서 실시한 결과 음성으로 결과가 산출되었을 경우 *in vitro*의 염색체이상시험결과를 부정해 버린다는 것은 위험하다 할 수 있다. 그 물질이 골수세포에 확실히 작용하고 있는지 혹은 구조적으로 소핵시험에서는 검출되기 어려운 물질은 아닌지 또는 기타의 시험에서의 결과는 어떠한가 등을 고려하여 판단하여야만 할 것이다. 또 변이원성 연구 또는 변이원성시험의 발전을 위해서는 골수세포를 이용한 시험에 필적할만 하거나 보조할 수 있는 *in vivo* 변이원성시험이 요구된다.

본 연구에서는 현실적으로 골수를 이용한 소핵시험의 이점과 실험업적 등을 고려하고, 또한 골수세포를 이용한 소핵시험에서 음성으로 결과산출되는 발암물질의 표적기관이 주로 간장인 물질들이 많음을 파악하여 이전의 세포유전학적 방법에서 음성의 결과를 나타내었던 2BP를 대상으로 간세포에서의 소핵시험을 실시함으로써 그 결과를 골수세포를 이용한 소핵시험의 결과와 그 장단점 및 2BP에 대한 변이원성을 구체적으로 평가하고자 하였다.

## II. 연구방법

### 1. 시약

본 연구의 연구대상물질인 2-bromopropane (2BP, CAS No. 75-26-3)은 日本 東京化成(株)에서 구입하여 사용하였으며 그 순도는 99%이었다. 간관류액의 조제시 사용한 EGTA [ethylenebis (oxyethylenenitrilo) tetraacetic acid], HEPES(N-2-hydroxyethylpiperadine-N'-2-ethansulfonic acid), collagenase, trypsin inhibitor 그리고 간세포내 핵 및 소핵의 형광염색액으로 사용하는 DAPI(4,6-di9amino-2-phenylindole dihydrochloride) 등의 시약은 Sigma제의 것을 사용하였다. 2BP를 실험동물에 투여하기 위하여 사용한 희석제는 日本 藥理化學工業(株)의 olive oil을 사용하였다.

### 2. 사용동물

본 연구에서는 SPF (specific pathogen free)로 사육된 Sprague-Dawley계의 흰 쥐를 간세포 소핵시험을 위해서는 수컷 30마리를, 골수세포 소핵시험을 위해서는 암수 각 40마리씩 대한실험동물센터(주)에서 구입하여 실험동물로 사용하였으며, 도입시 주령은 간세포 소핵시험의 것은 6주령의 것으로 2주간 순화시킨후 실험에 사용하였으며 골수세포 소핵시험용은 7주령의 것을 1주간 순화시킨후 실험에 사용하였다. 순화기간 및 실험기간동안 모든 동물은 온도( $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ )와 습도 ( $55 \pm 7\%$ )가 일정하게 조절되어 있는 안전 크린랙 [MJ-721 CS(P), Myung-jin, Korea] 에서 사육하였다. 실험동물들은 제일제당 주식회사에서 생산한  $\gamma$  선을 조사하여 멸균시킨 EP 고형배합사료 및 인천시 수도물을 1차 여과한 물을 먹여 사육하였다. 동물들은 폴리카보네이트제의 케이지 한 개당 3마리씩을 수용하였으며, 각 실험군당 동물을 할당할 경우 증상이 있는 동물은 제거하고 체중측정 및 관찰은 일주일에 2번 실시하였다.

### 3. 실험방법

#### 1) 간세포를 이용한 소핵시험

##### (1) 실험농도 및 실험군의 설정

실험동물에 투여할 2BP의 농도는 2BP의 LD<sub>50</sub>치 (RTECS, 1995)의 약 1/3농도에 해당하는 1600 mg/kg b.w.를 최고농도로 하여 800, 400, 200 mg/kg b.w.의 5단계 농도 및 용매대조군의 여섯 실험군을 설정하여 한 실험군당 6마리씩 배정하되 군분류는 동물의 체중을 지표로 하여 총화임의추출법으로 실시하였다.

##### (2) 실험스케줄

동물의 간세포는 세포주기중 G<sub>0</sub> 기에 머물러 있으나 간조직의 일부를 제거 (partial hepatectomy)할 경우 간세포는 증식하게된다. 소핵은 바로 이 증식세포에서 관찰되는 것이므로 간세포에서의 소핵을 관찰하고자 할 때에는 물질의 투여 및 간의 부분적 절제가 적절히 이루어져야 한다. 간절제 1일후 세포분열이 가장 빠르게 일어나고 (Tates, 1980), 3-4일후에는 간중량이 회복되므로 본 연구에서의 실험스케줄은 Fig. 2와 같이 하였다.

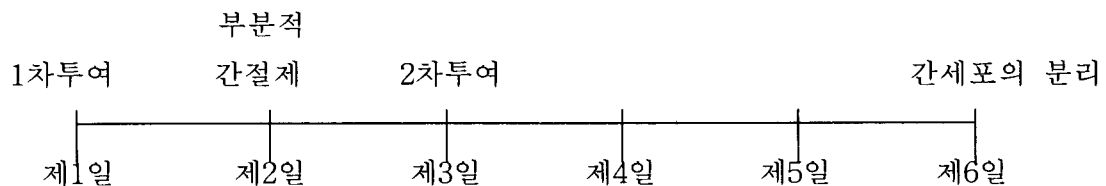


Fig. 2. The experimental schedule for rat liver micronucleus assay

군구성 당일 농도별 2BP를 복강내 1차투여를 실시하고 24시간후 간의 부분적 절제를 실시하였다.

간절제수술 24시간후 다시 2BP를 2차 투여하고 간절제 수술 4일후에 간절취 및 간세포를 분리하여 고정 및 형광염색하여 관찰하였다.

### (3) 2BP의 농도별 조제 및 투여방법

농도별 2BP는 olive oil을 사용하여 단계별로 희석 조제하였으며, 투여방법은 복강내 주사방법으로 투여량은 4 ml/kg b.w.로 하였다. 투여시기는 간의 부분적 절제의 전후에 두 번 투여하였다.

### (4) 간의 부분적 절제 및 관리

ether로 충분히 마취시킨 동물의 사지를 고정한 다음 알콜탈지면으로 털의 거꾸로 방향으로 문질러 복부 피부를 충분히 적시어 왼손의 검지 및 중지를 펼쳐 복부의 피부를 전후로 펼쳐가면서 면도칼로 검상돌기부위부터 복부에 걸쳐 털을 깎았다. 노출부위의 피부 및 주변의 털을 충분히 소독한 후 검상돌기 부분에 메스를 넣어 정중선에 연하여 피부를 절개한 후 소형의 핀셋으로 복강을 잡아 위로 당기면서 안과용 가위로 복강을 절개 하였다. 간장의 3분의 2 즉 외측, 내측좌엽 및 내측좌엽의 3개 간엽을 근원부까지을 손으로 눌러 밖으로 노출시켜 근원부를 결박한 다음 간엽을 절제하였다. 다시 개구부 및 주위를 알콜솜으로 잘 소독하고 봉합하여 수술 후 10분이내에 동물을 소생시켰다. 수술후의 동물은 청결한 케이지에 넣어 체온이 떨어지지 않도록 주의하여 관찰하였다. 본 실험에서 수술과정에서 2마리가 사망하였는데 이것은 간의 결박의 실패 혹은 절제하지 않은 간이 손상을 입어 출혈이 있는 것으로 간주되었다.

#### (5) 간세포 표본제작방법

간의 부분적 절제(PH, partial hepatectomy)를 실시한 4일후 실험동물을 phentobarbital natrium으로 마취시킨후 코르크판에 고정하였다. 동물을 각피한후 개복하여 간문맥을 노출시켰다. 미리 준비한 전관류액 (Table 5)을 peristaltic pump를 이용하여 약 14 ml/min의 유속으로 문맥을 통해 5분간 관류시키고 이때 하대동맥을 절단시켜 계속 관류시 간은 하얗게 탈혈되었다. 준비한 collagenase 용액 (Table 5)을 위와 같은 유속으로 7분간 관류시킨후 간을 적출하여 collagenase용액이 담긴 플라스틱 샤레에 넣어 간세포를 수술용 가위로 분산시켰다. 분산시킨 간세포를 가제 3장을 겹쳐 여과시킨 후 500 G의 원심속도로 1분간 원심분리 시켜 상등액을 버린다음 냉각시킨 Hanks액을 가해 다시 원심분리 시켰다. 같은 조작은 3회 반복하여 실시하였다. 남아있는 간세포는 10% 중성포르말린용액으로 고정하여 두었다.

#### (6) 표본의 염색 및 소핵의 관찰

고정된 간세포 현탁액과 40  $\mu\text{g/ml}$  농도의 DAPI 용액을 1:1로 섞어 염색된 세포 현탁액을 슬라이드그라스에 떨어뜨리고 커버글라스를 올린 다음 365 nm의 UV filter가 장착된 형광현미경 (NIKON OPTIPHOT-2)으로 관찰하였다. 간세포는 한 마리당 1000개 이상을 관찰하였으며 이때 밝은 푸른색의 형광을 나타내는 간세포의 소핵을 관찰하였다. 표본슬라이드는 모두 코드화하여 관찰하였으며 정상의 형태를 나타내는 간세포를 대상으로 슬라이드의 두 영역에서 각각 500개씩을 400배에서 관찰하였다. 소핵의 기준은 핵과 같은 양상으로 염색된 것으로 원형의 것을 대상으로 하되 핵의 직경의 1/4이하의 크기의 것을 관찰하였다 (Braithwaite and Ashby, 1988; Cleit et al., 1989).

Table 5. The composition of the perfusion solutions

| Reagents                         | Preperfusion<br>solution(g) | Collagenase<br>solution(g) |
|----------------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| NaCl                             | 8.0                         | 8.0                        |
| KCl                              | 0.4                         | 0.4                        |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 0.06                        | 0.06                       |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 0.09                        | 0.09                       |
| EGTA                             | 0.195                       |                            |
| HEPES                            | 2.39                        |                            |
| NaHCO <sub>3</sub>               | 0.35                        |                            |
| EGTA                             | -                           | 0.5                        |
| Collagenase                      | -                           | 0.05                       |
| Trypsin inhibitor                | -                           | 0.56                       |
| CaCl <sub>2</sub>                |                             | 0.56                       |

## 2) 골수세포를 이용한 소핵시험

본 연구에서의 소핵시험은 우리 연구실에서 실시한 2BP의 28일 반복투여시험과 병행하여 실시하였다. 소핵시험의 기본적 실험기법은 일반적으로 제시된 방법 (CSGMT, 1990)에 따라 실시하였으나 실험조건과 농도의 설정등은 다소 변경하였다. 투여는 일주일에 6일간 하루 한 번씩 복강내 투여를 실시하였고 이는 28일간 반복되었다. 투여농도는 125, 250 및 500 mg/kg b.w./day로 하였으며 각 실험군은 각각 20마리씩으로 하였다. 최종투여 24시간후 골수세포를 채취하여 도말표본을 작성하였다. 염색은 Hayashi들(1983)의 방법으로 acridine orange로 형광염색하여 형광현미경(OPTIPHOT-2, Nikon, Japan)으로 관찰하되 1000개의 다염성적혈구에서 소핵을 가진 다염성 적혈구 (MNPCE) 의 빈도를 산출하였다. 또한 동시에 100개의 전체 적혈구 (정염성 적혈구 + 다염성적혈구)에서 다염성 적혈구의 비율을 관찰하였다.

#### 4. 통계처리

간세포에서의 소핵빈도 평균에 있어 용매대조군과 2BP처리군과의 유의성검정은 ANOVA분석 및 Duncan의 다중비교를 실시하였다.

콜수세포에서의 소핵빈도에 대한 것은 Kastenbaum과 Bowman (1970)의 방법을 사용하였으며 PCE빈도에 대해서는 ANOVA 및 Duncan의 다중비교를 실시하였다.

### III. 연구결과

#### 1. 간세포에서의 소핵시험

##### 1) 동물관찰조건

본 연구에 사용한 Sprague Dawley계 흰쥐는 SPF의 동물로서 도입시 주령은 6주였으며 체중의 범위는 123.0 - 152.4 g이었으나 군구성시의 체중범위는 208.2 - 240.5 g이었다. 실험스케줄에 따라 군구성에서부터 최종 간세포를 분리할 때까지의 실험동물의 몸무게의 변화를 살펴보면 Table 6 및 Figure 3과 같다. 간의 부분적 절제이후의 몸무게는 용매대조군의 경우는 간절제 4일후 거의 회복되었으나 2BP 투여군에 있어서 회복양상은 차이가 있어 4일후에도 미처 회복되지 못했다.

Table 6. The changes of body weight of rats during experiments (g)

| Groups         | 제1일        | 제2일         | 제3일        | 제4일        | 제5일         | 제6일        |
|----------------|------------|-------------|------------|------------|-------------|------------|
| 0 mg/kg b.w.*  | 225.7±15.4 | 246.1±14.6  | 215.7±14.6 | 229.6±8.3  | 239.6±6 8.2 | 245.3±6.8  |
| 20 mg/kg b.w.  | 223.3±5.6  | 243.4±4.7   | 210.5±7.2  | 221.2±6.3  | 227.1±12.7  | 236.9±12.0 |
| 40 mg/kg b.w.  | 226.8±4.3  | 244.2±4.7   | 211.1±8.2  | 223.3±5.3  | 231.4±7.8   | 238.1±7.1  |
| 80 mg/kg b.w.  | 225.5±4.7  | 248.1±5.7   | 203.3±11.4 | 215.0±6.2  | 225.9±8.8   | 233.7±7.8  |
| 160 mg/kg b.w. | 224.7±14.2 | 243.74±17.1 | 198.1±17.0 | 201.5±14.2 | 210.0±26.9  | 216.2±30.0 |

\*, olive oil, 4 mg/kg b.w.

제 1일: 군구성 및 1차투여시 체중

제 2일: 2BP 1차투여 24시간후/ 간의 부분적 절제시 체중

제 3일: 간절제 24시간후/ 2BP의 2차 투여시 체중

제 4일: 간절제 2일째 체중

제 5일: 간절제 3일째 체중

제 6일: 간절제 4일째/ 간세포분리시 체중



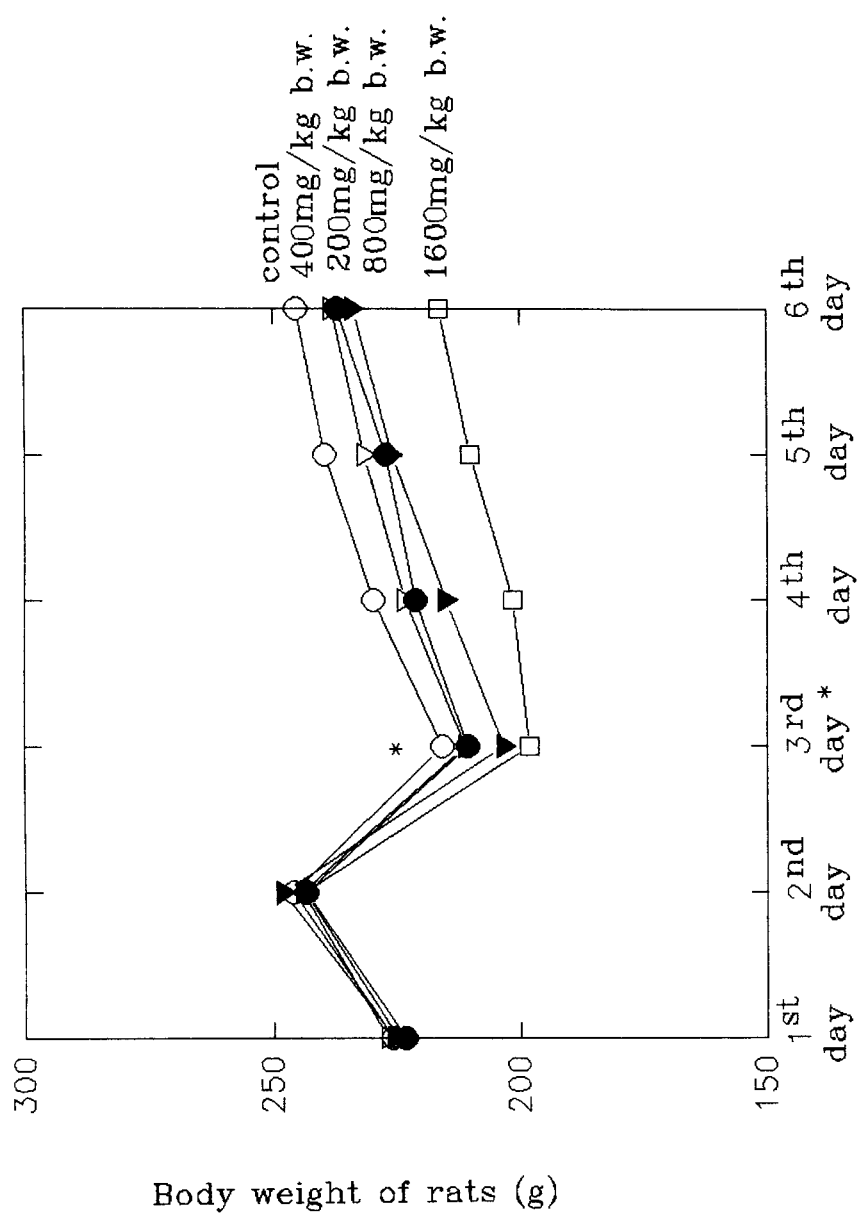


Fig. 3. The changes of body weight of rats before and after hepatectomy

\* 3rd day: the day of hepatectomy

실험을 진행하는 과정에 있어 최초 각 실험군당 6마리씩 총 30마리를 사용하였으나 부분적 간절제의 실험조작시 다량의 출혈로 인해 한 마리가 사망하였고 또 2BP의 2차 투여이후 한 마리가 돌연히 사망함에 따라 최종 간세포의 분리는 총 28마리에서 이루어졌다.

## 2) 간세포에서의 소핵유발

각 실험군에서 분리한 간세포에서 관찰한 소핵유발간세포의 빈도는 Table 7 및 Figure 4과 같았다. 용매대조군에서의 평균빈도는  $0.22 \pm 0.08\%$  이었으며, 투여군 즉, 2BP의 농도 200 mg/kg b.w. 에서 소핵을 가진 간세포의 평균빈도는  $0.53 \pm$

Table 7. Frequency of micronucleated hepatocytes in partially hepatectomized rat liver after intraperitoneally injected twice with 2BP

| Dose(mg/kg b.w.) | MNH/1000hepatocytes |   |   |   |   |   | Mean $\pm$ SD(%)  |
|------------------|---------------------|---|---|---|---|---|-------------------|
| 0 <sup>a</sup>   | 2                   | - | 1 | 2 | 3 | 3 | $0.22 \pm 0.08$   |
| 200              | 4                   | 4 | 5 | 6 | 9 | 4 | $0.53 \pm 0.20^*$ |
| 400              | 5                   | 6 | 4 | 5 | 8 | 6 | $0.57 \pm 0.14^*$ |
| 800              | 8                   | 4 | 4 | 6 | 5 | 5 | $0.53 \pm 0.15^*$ |
| 1600             | 6                   | 5 | - | 9 | 6 | 3 | $0.58 \pm 0.22^*$ |

MNH, micronucleated hepatocyte

Each group consisted of 6 rats.

<sup>a</sup>, olive oil, 4 mg/kg b.w.

\*,  $p < 0.05$

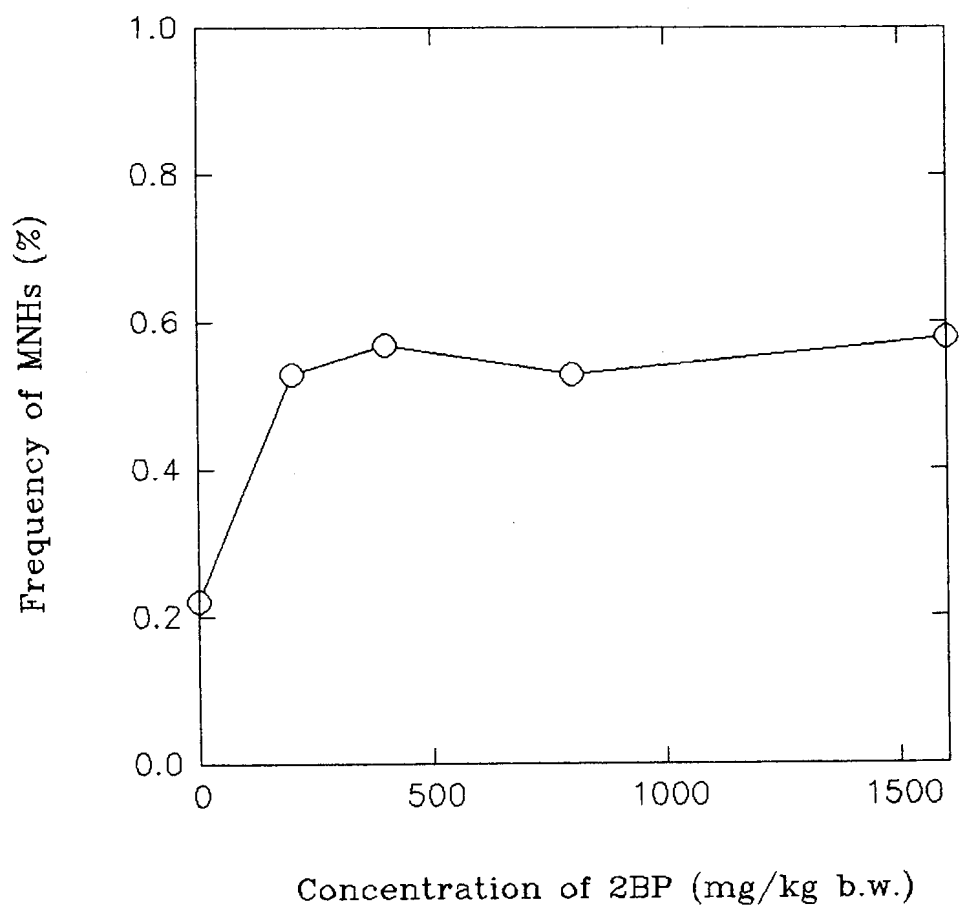


Fig 4. Frequencies of micronucleated hepatocytes (MNHs) in partially hepatectomized rat liver after intraperitoneally injected twice with 2BP

0.20%이었으며 400, 800 및 1600 mg/kg b.w.에서는 각각  $0.57 \pm 0.14\%$ ,  $0.53 \pm 0.15\%$  및  $0.58 \pm 0.22\%$ 로 용매대조군( $0.22 \pm 0.08\%$ )에 비하여 통계적으로 유의한 차이 ( $p < 0.05$ )가 있어 간의 부분적 절제로 간세포분열을 유도하였을 경우 2BP에 의해 간세포에서 소핵이 유발됨을 확인할 수 있었다.

## 2. 골수세포에서의 소핵시험

### 1) 동물관찰조건

2BP 투여 전후의 각 실험군의 체중을 비교하면 Table 8 과 Table 9과 같다. 실험기간동안 암컷 한 마리가 투여시 내출혈을 일으켜 사망하였다. 대조군에 비해 28일간 2BP를 투여한 결과 수컷의 경우 250 및 500 mg/kg b.w./day의 농도군에서, 그리고 암컷의 경우 모든 농도단계에서 통계적으로 유의한 체중의 차이가 관찰되었다.

### 2) 골수세포에서의 소핵유발

골수에서 소핵을 가진 다염성적혈구 (MNPC)의 평균빈도는 Table 10과 같았다. 대조군과 비교하여 시험한 어떠한 농도단계에서도 소핵빈도가 증가되지 않았다. 따라서 2BP를 28일간 복강내로 반복투여하여 실시한 골수세포를 이용한 소핵시험에서 2BP는 소핵을 유발시키지 않아 세포유전독성이 나타나지 않은 것으로 관찰되었다. 단지 PCE의 비율에 대한 결과를 보면 (Table 10), 수컷의 경우 125 mg/kg b.w./day 투여군에서는  $30.67 \pm 8.45\%$ , 250 mg/kg b.w./day 투여군에서는  $25.10 \pm 3.23\%$ , 500 mg/kg b.w./day 투여군에서는  $22.42 \pm 3.24\%$ 으로 대조군에 비해 유의하게 차이가 있었으며, 암컷의 경우도 마찬가지로 125 mg/kg b.w./day 투여군에서는  $27.64 \pm 5.48\%$ , 250 mg/kg b.w./day 투여군에서는  $22.31 \pm 5.52\%$ , 500 mg/kg b.w./day 투여군에서는  $22.31 \pm 5.52\%$ 으로 대조군에 비해 차이가 있었다. 이것은 2BP가 이 농도단계에서 골수에서의 조혈작용에 어떤 영향은 있었음을 시사하고 있다.

Table 8. The body weights of male rats before and after 28 day treatment

| Dose<br>(mg/kg b.w./day) | No. of<br>animals | Body weight<br>before treatment<br>Mean $\pm$ SD (g) | Body weight<br>after treatment<br>Mean $\pm$ SD (g) |
|--------------------------|-------------------|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| 0                        | 10                | 300.51 $\pm$ 14.35                                   | 356.72 $\pm$ 6.16                                   |
| 125                      | 10                | 300.68 $\pm$ 12.68                                   | 352.49 $\pm$ 11.83                                  |
| 250                      | 10                | 300.29 $\pm$ 12.73                                   | 330.44 $\pm$ 10.69*                                 |
| 500                      | 10                | 301.39 $\pm$ 13.26                                   | 289.79 $\pm$ 15.98*                                 |

\*,  $p < 0.05$ .

Table 9. The body weights of female rats before and after 28 day treatment

| Dose<br>(mg/kg b.w./day) | No. of<br>animals | Body weight<br>before treatment<br>Mean $\pm$ SD (g) | Body weight<br>after treatment<br>Mean $\pm$ SD (g) |
|--------------------------|-------------------|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| 0                        | 10                | 202.35 $\pm$ 7.10                                    | 226.72 $\pm$ 10.53                                  |
| 125                      | 10                | 202.78 $\pm$ 6.39                                    | 215.23 $\pm$ 6.08*                                  |
| 250                      | 10                | 202.02 $\pm$ 6.32                                    | 216.37 $\pm$ 5.26*                                  |
| 500                      | 9                 | 202.46 $\pm$ 6.47                                    | 202.12 $\pm$ 9.27*                                  |

\*,  $p < 0.05$

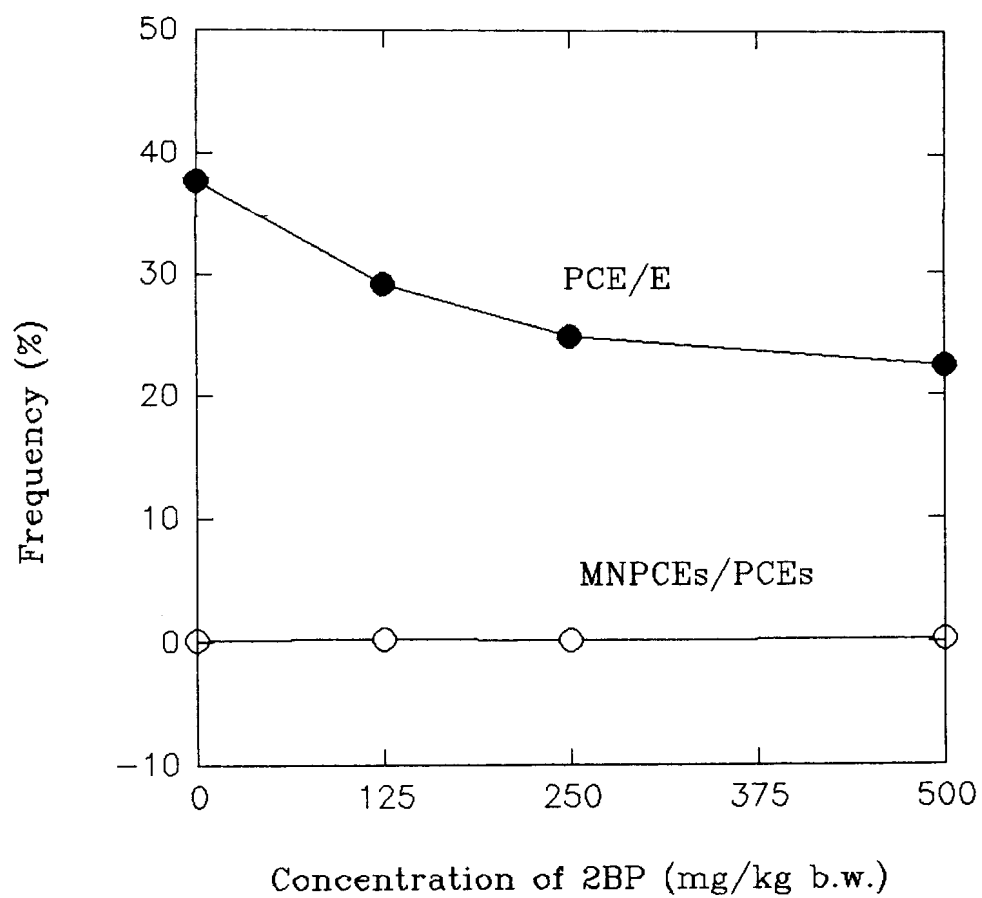


Fig. 5. Frequencies of MNPCE induced by 28 day treatment of 2BP

Table 10. Results of the bone marrow micronucleus assay by repeated intraperitoneal injection with 2BP for 28 days

| Dose<br>(mg/kg<br>b.w.) | Sex          | No. of<br>animals | No. of PCEs<br>observed | MNPCEs/PCEs<br>Mean $\pm$ SD (%)  | PCE/E<br>Mean $\pm$ SD (%)          |
|-------------------------|--------------|-------------------|-------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| 0a                      | M            | 10                | 10,000                  | 0.20 $\pm$ 0.20                   | 39.42 $\pm$ 8.45                    |
|                         | F            | 10                | 10,000                  | 0.11 $\pm$ 0.07                   | 36.04 $\pm$ 6.08                    |
|                         | <b>total</b> | <b>20</b>         | <b>20,000</b>           | <b>0.15 <math>\pm</math> 0.15</b> | <b>37.73 <math>\pm</math> 7.37</b>  |
| 125                     | M            | 10                | 10,000                  | 0.21 $\pm$ 0.12                   | 30.67 $\pm$ 5.65*                   |
|                         | F            | 10                | 10,000                  | 0.17 $\pm$ 0.15                   | 27.64 $\pm$ 5.48*                   |
|                         | <b>total</b> | <b>20</b>         | <b>20,000</b>           | <b>0.19 <math>\pm</math> 0.14</b> | <b>29.13 <math>\pm</math> 5.65*</b> |
| 250                     | M            | 10                | 10,000                  | 0.19 $\pm$ 0.10                   | 25.10 $\pm$ 3.23*                   |
|                         | F            | 10                | 10,000                  | 0.18 $\pm$ 0.10                   | 24.48 $\pm$ 3.10*                   |
|                         | <b>total</b> | <b>20</b>         | <b>20,000</b>           | <b>0.18 <math>\pm</math> 0.10</b> | <b>24.79 <math>\pm</math> 3.10*</b> |
| 500                     | M            | 10                | 10,000                  | 0.25 $\pm$ 0.15                   | 22.42 $\pm$ 3.24*                   |
|                         | F            | 9                 | 9,000                   | 0.17 $\pm$ 0.12                   | 22.31 $\pm$ 5.52*                   |
|                         | <b>total</b> | <b>19</b>         | <b>19,000</b>           | <b>0.21 <math>\pm</math> 0.14</b> | <b>22.37 <math>\pm</math> 4.39*</b> |

a, vehicle, olive oil; PCE, polychromatic erythrocyte; MNPCE, micronucleus in PC6E; M, male; F; female; \*  $p < 0.05$ .

#### IV. 고 찰

본 연구에서의 주된 목적은 2BP에 대한 *in vivo*의 소핵시험을 실시함에 있어 표적기관을 골수 및 간장에 맞추어 실시함으로서 표적기관에 따른 소핵시험결과를 비교하고 각 시험법의 장단점을 유기용제 2BP를 통해 논하고자 함에 있다. 저자들은 2BP에 대한 변이원성을 조사하기 위하여 이전의 시험들 (Maeng & Yu, 1995)에서 2BP는 살모넬라 TA100 및 TA1535를 이용한 변이원성시험에서만 양성의 결과를 보이고, *in vitro* 시험인 배양세포를 이용한 염색체이상시험과 14일 반복투여에 따른 흰쥐 골수 소핵시험에서 음성의 결과를 나타내었음을 확인하였다. 그러나 그결과로 부터 *in vitro*의 세포유전학적 시험방법의 제한점 즉 2BP가 저비점의 휘발성 물질이어서 실험진행의 어려움 등을 고찰하였었다. 또한 *in vivo* 시험법인 14일 복강내 반복투여 골수시험에 있어서의 음성의 결과 또한 표적기관이 골수에 국한했다는 점을 찾아, 소핵시험에 있어서 골수를 대상으로 할 경우 투여용량을 더 높이고 또한 표적기관을 달리한 소핵시험의 필요성을 가지게 되었다. 따라서 본연구에서 저자들은 2BP에 대해 흰쥐를 대상으로 한 *in vivo*의 방법인 소핵시험을 골수에서는 28일간의 복강내 반복투여를 통해 다염성적혈구에서, 그리고 표적기관을 간장에 맞추어 간세포에서 실시한 바, 각각 상이한 결과를 산출하였다. 즉 골수를 이용한 소핵시험에서는 2BP 투여에 따른 소핵유발이 관찰되지 않았으나 부분적 간절제를 통해 간세포분열을 유도함으로서 실시한 간세포를 이용한 소핵시험에서는 2BP 투여에 따른 소핵유발이 관찰되었다. 이와 같은 결과는 1,2-dibromopropane(DBP) 및 1,1,3-tribromopropane(TBP)에서의 결과 (Belitsky et al., 1994)와 동일하였다. DBP의 경우는 흰쥐의 전위 (forestomach)에서도 소핵이 유발됨이 보고된 바 있으며, 살모넬라 균주를 이용한 Ames시험에 있어서는 대사활성화와는 무관하게 약한 변이원성을 나타낸다는 보고 (Stoltzenber & Hine, 1980)와 음성의 결과 (Zoetemelk et al., 1987)등 서로 다른 보고들이 있었다.

본 연구의 간세포에서의 소핵시험결과 (Fig. 3)에서는 소핵유발빈도가 투여농도 400 mg/kg. b.w. ( $LD_{50}$ 의 약 10% 용량)까지 증가양상을 보이나 보다 높은 농도에서는 더 이상의 증가를 보이지 않고 평평한 곡선양상 (plateau)이 되는 것을 볼 수



있는데 이는 Belitsky 들(1994)이 언급하길 bromopropane에 의해 유도되는 통계적으로 유의한 소핵빈도의 증가는 0.1LD<sub>50</sub>의 농도에서 부터는 평평한 곡선 (plateau)에 이르며, TBP 및 DBCP (1,2-dibromo-3-chloropropane)에서는 0.02 LD<sub>50</sub>의 농도에서 편편해진다고 한 결과와 같았다. 또한 이들은 이러한 양상은 간장 효소의 활성화 및 해독작용의 균형에 의한다고 하였다.

DBP 및 TBP와 비교하여 2BP에 대한 발암성에 대한 잠재위험성을 비교해 보면 DBP는 살모넬라 Ames시험에서의 변이원성이 불명확하고, TBP는 외부에서의 대사활성화가 이루어진 후 살모넬라 TA100에서의 변이원성이 확인된 반면 2BP의 경우 TA100 과 TA 1535에서 강한 변이원성을 나타내었으며, 세포유전학적 측면에서 보면 2BP는 DBP 및 TBP와 마찬가지로 간세포에서의 소핵을 유발시켰다. 이외의 실험결과에 있어서는 상호 비교하기에는 데이터가 부족하여 불가능하나 같은 BP의 경우라 하더라도 brome의 위치 및 수에 따라 서로 다른 활성조건을 가지므로 잠재위험성의 차이는 있다고 볼 수 있다. MacDonald (1980)의 보고에 따르면, halopropane은 두가지 주요 경로 즉 glutathion과의 접합(conjugation)과 마이크로솜 효소에 의한 산화작용을 통해 생체내에서 활성화된다고 하였다. 또한 치토크롬 P450계내에서 halopropane은 C1, C2 의 두 기능적 산화물로 전환되고 C1, C3나 혹은 C1, C2, C3에 대한 산화물로는 아주 적게 전환된다고 하였다. 또한 일반적인 haloalkane oxidation의 강도는 치환원자의 수에 따라 증가한다고 알려져 있어 일반 개념으로는 TBP가 가장 많이 산화될 가능성이 많으나 실제 2BP에 대한 발암성의 잠재위험성 또한 지금까지의 변이원성시험 결과 비교적 높다할 수 있다.

간세포에 대한 소핵시험은 간의 부분적 절제 및 간세포의 분리에 대한 실험적 기법이 개발되어 감에 따라 근래에 이르러 특히 간암유발성이 의심되는 물질을 대상으로 시험기법이 활용되어 왔다 (Tates et al., 1980, 1989, 1990). 골수와는 달리 간조직은 간접적으로 작용하는 물질 예를 들어 특이한 간효소에 의한 대사활성을 요구하는 물질에 대해서 높은 민감도를 나타내므로 소핵시험의 대상조직으로서의 장점을 가지고 있는 것으로 알려져 있다 (Rossi et al., 1987; George et al., 1989; van de Poll et al., 1989; Benning et al., 1992). 또한 이온화 방사선에 대한 여러 가지 clastogenic 효과에 대해 연구하는데도 흔히 사용되었다 (Tates, et al., 1982).

또한 최근에는 간세포를 이용한 소핵시험이 외부적 빔 (beam) 조사 및 내부적 방사선면역요법에 의한 낮은 용량의 방사선효과에 대한 평가시 민감하고 신뢰성있는 방법임이 보고되었다 (Ono et al., 1990; Sakahara et al., 1992).

최근 화학물질에 대한 여러 국제기구 및 각 국의 규제시험 가이드라인에서 제시되고 흔히 사용하고 있는 설치류 골수세포를 이용한 소핵시험의 특이도(specificity)가 낮아 신뢰성이 의심되고 있는 한편 골수를 이용한 소핵시험에서 음성의 결과를 나타내었던 화학물질들이 표적기관을 간장에 둔 간세포를 이용한 소핵시험에서는 양성 결과를 나타내는 보고들 (Noguchi et al, 1994; Herens et al., 1995)이 있어 이 방법의 장점과 함께 제한점을 고려하고 기존 및 신규화학물질 특히 Ames시험, 염색체이상 시험등에서 비변이원성 물질로 나타난 물질에 대한 좀더 정확한 발암성을 예측하는데 있어 활용가능성 등을 고찰할 필요성이 있다.

간세포 소핵시험의 장점은 골수와는 달리 간조직은 발암현상에 간접적으로 작용하는 물질 예를 들어 특이한 간효소에 의한 대사활성을 요구하는 물질에 대해서 높은 민감도를 나타내므로 소핵시험의 대상조직으로서의 장점을 가지고 있는 것으로 알려져 있다 (Rossi et al., 1987; George et al., 1989; van de Poll et al., 1989; Benning et al., 1992). 소핵시험이외에 간세포를 이용하는 변이원성 시험으로서 흔히 사용되고 있는 방법으로는 부정기 DNA합성 (UDS, unscheduled DNA synthesis), 복제 DNA 합성 (RDS, replicative DNA synthesis)시험 및 산화적 DNA 손상등을 들 수 있는데 이중 RDS 및 산화적 DNA 손상시험은 특히 최근에 이르러 비변이원물질의 발암성을 나타내는데 높은 신뢰도를 가진다고 알려지고 있다 (Uno et al., 1992; Takasawa et al., 1994; Adachi et al, 1994). 어느 방법이든 in vivo의 방법으로서 간세포를 이용하는 시험방법을 많은 화학물질에 대해 광범위하게 적용하기에는 실험의 복잡성 및 기술적 어려움으로 크게 두가지 제한점을 가지게 되는데 첫째는 분열촉진 (mitotic stimulation)의 과정이며 둘째는 간조직을 분산시켜 단일세포현탁액을 만드는 과정이 어렵고 시간이 오래 걸린다는 점이다. 소핵은 분열과정에 있는 세포에서만 발현되는 것이고 성숙한 설치류의 간의 분열능은 거의 0에 가깝기 때문에 실험적으로 분열촉진을 유도해야 하고 흔히 쓰는 방법이 본 연구에서도 사용하였던 부분적 간절제 (partial hepatectomy)이다.

간절제술의 난이함에 대처하여 최근에는 유전독성이 없는 화학적 분열촉진제 (chemical non-mutagenic hepatomitogens, Braithwaite & Ashby, 1988; Ashby et al., 1989)를 사용하여 유사분열을 유도하는 방법이 제안되기도 하였고 또한 간독성 물질인 사염화탄소를 실험동물에 흡입폭로시킴으로 유사분열을 일으키는 방법등이 제시된바 있다 (Uryvaeva et al, 1995). 또한 간세포분리의 어려움을 대신하는 방법으로 최근 제시된 것으로는 미리 고정액으로 고정시킨 간조직을 alkaline dissociation시키는 방법등이 제시되어 (Uryvaeva et al., 1995) 간세포소핵시험의 단점을 보완하기 위한 여러 가지가 개발되어 가고 있다.

Ames시험, 포유류 배양세포를 이용한 염색체 이상 시험, 골수세포를 이용한 소핵시험 등의 통상적 변이원성 시험에서 검출되지 못하는 발암물질들은 발암과정에서 발암 initiation활성보다는 promotion활성을 갖기때문이고 기존의 시험법은 initiation활성만을 검출하기에 적합하기 때문이다. 발암성에 대한 보다 검출력있기 위해 추가적으로 필요한 발암 promoter 활성을 검출하는 시험에 대한 연구가 차츰 많아지고 있는 경향 (Uno et al., 1992; Clayson et al., 1989; Rao et al., 1989)이 있다. Herens 등(1995)은 간암유발물질인 diethylnitrosamine을 사용하여 유도된 발암 과정 즉 initiation, promotion 및 progression에서 각각 간세포소핵을 측정함으로써 간세포소핵은 주로 initiation단계가 아니라 promotion 및 progression단계를 반영하는 것임을 관찰하였다.

본 연구시험결과에 있어서 in vitro의 염색체이상시험과 골수세포를 이용한 소핵시험에서 음성의 결과를 보여 clastogenicity가 없는 것처럼 보였던 2BP에 있어 간세포소핵유발성이 관찰됨에 따라 발암 promotion의 가능성을 제시하였다. 이전의 저자들의 연구결과 2BP는 Ames 시험에서도 양성이었으므로 2BP는 발암 initiation활성 및 promotion활성을 함께 가질 수 있는 물질임을 알 수 있으므로 향후 이를 확인할 수 있는 RDS, UDS 등의 다른 추가적 변이원성 시험과 함께 장기적으로는 2실험동물을 이용한 발암성시험도 함께 이루어져야 할 필요성이 제시되었다. 또한 2BP는 1995년 LG전자회사의 집단중독사고시 생식독성물질로 구명된 바 있으나 이들 폭로근로자들에 대한 암발생의 가능성에 대해서도 추후 추적조사가 계속되어야 할 것이다.

변이원성시험의 목적은 유전자기능의 메카니즘을 이용하여 화학물질이 직간접적으로 유발시킨 DNA손상과 유전적 장애를 검출하는 것이다. 이 시험에서 양성을 나타내는 화학물질은 사람에게 대해서 발암성과 유전적 질환을 유발할 가능성이 있는 것으로 여기고 있다. 최근 통상의 변이원성시험의 신뢰성이 낮음이 보고됨에 따라 발암성물질의 약 20%는 통상의 변이원성시험으로 검출할 수 없는 소위 비변이 발암성물질이 되고 있다. IARC에서 평가한 발암물질 총 280 종류중 104 종류에 대해 골수세포에서의 소핵유발성을 검색한 결과 (Moria, T., 1992), IARC의 group 1, 2A, 2B로 분류된 화학물질은 각각 69%, 55%, 46%의 민감도를 나타내었으며, 사람에게 암발생의 위험성이 높은 만큼 소핵시험에서 양성으로 됨이 보고되었다. 이 양성물질을 살펴보면, adridine류, sulfonate류, hydrazine류, aminobiphenyl류, azo화합물류가 다수인데 여러 장기에 발암성을 유발하는 것일수록 양성률의 비율이 높았고 폐, 간, 조혈계조직을 표적장기로 하는 발암성 물질일수록 소핵에서 양성이었다. 또 음성결과를 나타내는 것은 금속화합물류, 방향족 아민류, 할로젠화합물류, 합성스테로이드류, 호르몬류등이었다. 이렇듯 소핵시험 하나에 있어서도 발암물질의 검출스펙트럼에 특징이 있음을 알 수 있다.

이러한 현상으로 특히 발암성 예측의 관점에서 각종 변이원성시험의 특징을 파악하여 각각 유효하게 사용할 필요가 있다. 한두가지 시험결과로서 직접적으로 판단할 것이 아니라 여러 시험결과를 도출시켜 약물역동학 (pharmacokinetics) 및 구조활성상관 (structure activity correlation) 등을 도입하여 종합적인 평가에 의해 화학물질의 발암성을 예측할 필요가 있다. 이에 UDS 시험, 간의 소핵시험, transaction mouse, 사람의 약물대사효소를 도입한 세포의 사용등은 유효한 정보를 제공할 것으로 사료된다. 또 RDS시험은 세포의 증식관련 시그날에 영향을 미치는 receptor를 매개하는 발암성 물질의 검출에 유효하며, 간의 소핵시험의 경우 발암 promoter활성으로 clastogenicity를 갖는 물질에 유효하리가 사료된다.

## V. 결론 및 요약

본 연구에서는 화학물질등의 발암성 예측을 위해 OECD등 국제기구 및 각 국의 관청이 독성시험가이드라인에 제시하고 있는 in vitro염색체이상시험과 in vivo의 설치류 골수를 이용한 소핵시험을 통해 비변이원물질인 할로젠화합물 2-bromopropane을 대상으로하여 흰쥐 골수세포 및 간세포에서의 소핵시험을 실시함으로써 표적기관에 따른 결과를 서로 비교하고 각 시험법의 장단점을 고찰하여 골수세포 소핵시험의 대체적 혹은 보완적인 발암성 예측시험법으로서 간세포 소핵시험의 활용성을 살펴본 결과 다음과 같았다.

- 1) 간의 부분적 절제를 통해 분열을 유도시킨 간세포에서 소핵을 관찰한 결과 2BP에 의해 유도된 평균 간세포소핵유발빈도는 용매대조군은  $0.22 \pm 0.08\%$ , 2BP농도 200 mg/kg b.w. 실험군에서는  $0.53 \pm 0.20\%$ , 400, 800 및 1600 mg/kg b.w.에서는 각각  $0.57 \pm 0.14\%$ ,  $0.53 \pm 0.15\%$  및  $0.58 \pm 0.22\%$ 로 각 투여군은 용매대조군에 비하여 통계적으로 유의한 차이 ( $p < 0.05$ )가 있었다.
- 2) 간의 부분적 절제후 최종 간세포분리까지의 흰쥐의 체중회복정도는 2BP의 투여군과 대조군간에 차이가 있었다.
- 3) 2BP를 28일간 복강내 반복투여한 흰쥐의 골수에 관찰한 소핵유발 다염성적혈구의 평균빈도는 125 mg/kg b.w. 실험군에서는  $0.19 \pm 0.14\%$ , 250 mg/kg b.w. 실험군에서는  $0.18 \pm 0.10\%$  및 500 mg/kg b.w. 실험군에서는  $0.21 \pm 0.1\%$ 으로 용매대조군에 비하여 소핵유발빈도가 증가하지 않았다.
- 4) 2BP 투여 전후의 각 실험군의 체중변화관찰결과 대조군에 비하여 수컷의 경우 250 및 500 mg/kg b.w. 실험군에서, 암컷의 경우 모든 농도단계에서 통계적으로 유의한 체중의 차이가 관찰되었다.
- 5) 본 연구결과 2BP는 흰쥐 골수세포를 이용한 소핵시험에서는 음성의 결과를 나타내었으나, 간세포를 이용한 소핵시험에서는 양성의 결과를 나타내어 동물세포에 있어 염색체이상(clastogenicity)을 유발함을 확인할 수 있었다.
- 6) 따라서 in vitro의 염색체이상과 in vivo의 골수세포 소핵시험에서 비변이원물질

로 검출되는 할로젠화합물의 경우 좀더 정확한 발암성예측을 위해서 간세포를 이용한 소핵시험이 매우 유효함을 확인하였다.

## VI. 참고문헌

Adachi, S., Kawamura, K. and Takemoto, K.(1994). Increased susceptibility to oxidative DNA damage in regenerating liver. *Carcinogenesis* 15, 539-543.

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

Ashby, J., Mohammed, R., Lefevre, P.A. and Bandara, L.(1989). Quinoline: unscheduled DNA synthesis and mitogenesis data from the rat liver in vivo. *Environ. Mol. Mutagen.* 14, 221-228.

Belitsky, G.A., Lytcheva, T.A., Khitrovo, I.A., Safaev, R.D., Zhurkov, V.S., Vyskubenko, I.F., Sytshova, L.P., Salamatova, O.G., Feldt, E.G., Khudoley, V.V., Mizgirev, I.V., Khovanova, E.M., Ugnivenko, E.G., Tanirbergenov, T.B., Malinovskaya, K.I., Revazova, Yu. A., Ingel, F.I., Bratskavsky, V.A., Terentyev, A.V., Shapiro, A.A. and Williams, G.M.(1994). Genotoxicity and carcinogenicity testing of 1,2-dibromopropane and 1,1,3-tribromopropane in comparison to 1,2-dibromo-3-chloropropane. *Cell Biology and Toxicology* 10, 265-279.

Benigni, R.(1990). Rodent tumor profiles, salmonella mutagenicity and risk assessment. *Mutation Res.* 244, 79-91.

Benning, V., Pasquet, J.P., Thybaud, C., Melcion, C. and Cordier, A.(1992). Carcinogen/noncarcinogen in mouse hepatocyte micronucleus test. *Mutation Res.* 271, 159-160.

Braithwaite, I. and Ashby, J.(1988). A non-invasive micronucleus assay in the rat liver. Mutation Res. 203, 23-32.

Clayson, D.B., Nera, E.A. and Lok, E.(1989). The potential for the use of cell proliferation studies in carcinogen risk assessment, Regulatory toxicology and pharmacology 9, 284-295.

Cleit, I., Fournier, E., Melcion, C. and Cordier, A. (1989). In vivo micronucleus test using mouse hepatocytes. Mutation Res. 216, 321-326.

The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992). Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: The summary report of the 5th collaborative study by CSGMT/JEMS, MMS, Mutation Res. 278, 83-98.

The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1990). Single versus multiple dosing in the micronucleus test: The summary report of the collaborative study by CSGMT/JEMS.MMS. Mutation Res. 234, 205-222.

George, E., Buslinson, B. & Catehouse, D.(1989). Genotoxicity of 1- and 2-nitropropane in the rat. Carcinogenesis 10, 2329-2334.

Hayashi, M., Sofuni, T., Ishidate, M. Jr.(1983). An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test. Mutation Res. 105, 253-256.

Herens, C., Massart, S., Bouzahzah, B., Koulischer, L. and Barbason, H.(1995). Nuclear lesions during rat hepatocarcinogenesis. II. Measuring the micronuclei



during initiation, promotion and progression of rat hepatocarcinogenesis induced with diethylnitrosamine. *Mutation Res.* 329, 161-171.

Kim, Y., Jung, K., Hwang, Jung, G., Kim, H.J., Park, J.S., Kim, J.Y. and Park, J.S.(1996). Hematopoietic and reproductive hazards of Korean electronic workers exposed to solvents containing 2-bromopropane. *Scand. J. Work Environ. Health* 22, 387-391.

Lag, M., Dybing, E., Nelson, S.D., Soderlund, E.J.(1994). Mutagenic activity of halogenated propane and propenes: Effect of bromine and chlorine positioning. *Chem. Biol. Interact.* 93, 73-84.

MacCann, J., Choi, E., Yamasaki, E. and Ames, B.N.(1975). Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals. *Proc. Natl. Acad. Sci* 72, 5135-5139.

MacDonald, T.L.(1980). Chemical mechanisms of halocarbon metabolism. *Crit. Rev. Toxicol.* 11, 85-120.

맹 승희, 유 일재(1995). 2-bromopropane의 변이원성. 산업보건연구원 연구보고서 95.

Mavournin, K.H., Blakey, D.H., Cimino, M.C., Salamome, M.F. and Heddle, J.A.(1990). The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene Tox. Program. *Mutation Res.* 239, 29-80.

Morita, T.(1992). Evaluation of mouse micronucleus assay to screen carcinogens. *MMS Comm.* 6, 1-56.

Noguchi, T., Asakura, M., Sugiyama, T. and Matsushima, T.(1994). N-Nitroso-di-n-propylamine induces micronuclei in partially hepatectomized rat liver but not in mouse bone marrow cells. *MMS com.* 2. 79-82.

Ono, K.Y., Nagata, K., Akata, K., Abe, M., Ando, K. and Koike, S.(1990). Frequency of micronuclei in hepatocytes following X- and fast neutron irradiation- an analysis by a linear-quadratic model. *Radiat. Res.* 123, 345-347.

Purchase, I.F.H., Longstaff, E., Ashby, J., Styles, J.A., Anderson, D., Lefevre, P.A. and Westwood, F.R.(1976). Evaluation of six short recommendations for their use. *Nature* 264, 624-627.

Rao, V.R., Woo, Y-T., Iai, D.Y., Arcos, J.C.(1989). Database on promoters of chemical carcinogenesis. *J. Envir. Sci. Hlth.*, C7, v-xxxvi, 145-386.

Rossi, A.M., Romano, M., Laccaro, L., Pulci, R. & Salamone, M.(1987). DNA synthesis, mitotic index, drug-metabolizing system and cytogenetic analysis in regenerating rat liver. Comparison with the bone marrow test after in vivo treatment with cyclophosphamide. *Mutation Res.* 182, 75-82.

Sakahara, H., Ono, K., Saga, T., Akuta, K., Endo, K., Konish, J. and Abe, M.(1992). Hepatocyte response to continuous low dose-rate radiation in radioimmuno assessed by micronucleus assay. *Int. J. Radiat. Biol.* 62, 43-448.

Stolzenberg, S.J., Hine, C.H.(1980). Mutagenicity of 2- and 3-carbon halogenated compounds in the Salmonella/mammalian microsome test. *Environ. Mutagen* 2, 59-66.

Sugimura, T., Sato, S., Nagao, M., Yahagi, T., Matsushima, T., Seino, Y., Takeuchi, M. & Kawachi, T. (1976). Overlapping of carcinogens and mutagens, In: Magee, P.N., Takayama, S., Sugimura, T. & Matsushima, T. (eds), Fundamentals of Cancer Prevention, Baltimore, University Park Press, pp. 191-215.

高澤博修, 杉山明男, 馬場 博, 宇野芳文, 宮川 誠, 吉川 邦衛 (1994). Roles and limitations of mutagenicity tests - Detection of non-mutagenic hepatocarcinogens by means of RDS test -. 環境變異原研究 16, 113-126.

Tates, A.D., van de Poll, M.L.M., van Weillie, M. and Ploem, S.J.(1990). Use of in vivo micronucleus tests with mammalian cells for clastogenicity and carcinogenicity studies. in: G. Obe and A.T. Natarajan (Eds.), Chromosomal Aberrations. Springer Verlag, Berlin, pp. 242-259.

Tates, A.D. and der Engelse, L.(1989). The role of short-lived lesions in the induction of micronuclei in rat liver by ethylnitrosourea and methyl methanesulfonate: the importance of experimental design. Mutation Res. 210, 271-279.

Tates, A.D., Broerse, J.J., Neuteboom, I. and de Vogel, N.(1982). Differential persistence of chromosomal damage induced in resting rat-liver cells by X-rays and 4,2-MeV neutrons. Mutation Res. 92, 275-290.

Tennant, R.W. and Ashby, J.(1991). Classification according to chemical structure, mutagenicity to salmonella and level of carcinogenicity of a further 39 chemicals tested for carcinogenicity by the U.S. National Toxicology Program. Mutation Res. 257,209-227.

Tennant, R.W., Margolin, B.H., Shelby, M.D., Zeiger, E., Haseman, J.K., Spalding, J., Caspary, W., Resnick, M., Stasiewicz, S., Anderson, B.(1987). Prediction of chemical carcinogenicity in rodent from in vitro genetic toxicity assays. *Science* 236, 933-941.

Tomatis, L. and Bartsch, H.(1990). The contribution of experimental studies to risk assessment of carcinogenic agents in human. *Exp. Pathol.* 40, 251-266.

宇野芳文, 岩瀬裕美子, 吉川 邦衛 (1992). 変異原性試験の実施立場から, 変異原性研究 1992, 1975.

Uryvaeva, I.V. and Delone, G.V.(1995). An improved method of mouse liver micronucleus analysis: an application to age-related genetic alteration and polyploidy study. *Mutation Res.* 334, 71-80.

van de Poll, M.L.M., van der Hulst, D.A.M., Tate, A.D., Mulder, G.J. and Meerman, J.H.N.(1989). The role of specific DNA adducts in the induction of micronuclei by N-hydrox-2-acetylaminofluorene in rat liver in vivo. *Carcinogenesis* 1, 717-722.

吉川 邦衛(1993). 発癌性 豫測試験, *ファルマシア* 29, 45-48.

若田明裕, 大内田昭信, 鈴木 洋(1993). マウス小核試験の問題点. *環境変異原研究* 15, 97-101.

Yu, I.J., Chung, Y.H., Lim, C.H., Maeng, S.H., Lee, J.Y., Kim, H.Y., Lee, S.J., Kim, C.H., Kim, T.G, Lim, C.H., Park, J.S. and Moon, Y.H.(1995). Reproductive toxicity of 2-bromopropane. *Scand. J. Work Environ. Health* (in press).

---

Zeiger, E., Haseman, J.K., Shelby, M.D., Marglin, B.H. and Tennant, R.W.(1990). Evaluation of four in vitro genetic toxicity tests for predicting rodent carcinogenicity confirmation of earlier result with 41 additional chemicals. Environ. Mol. Mutagen, 18, 1-14.

Zoetmelk, C.E.M., Mohn, G.R., van der Gen, A., Breimer, D.D.(1987). 1,2-Dibromo compounds. Their mutagenicity in Salmonella strains differing in glutathione content and their alkylating potential. Biochem. Pharmacol. 36, 1829-1835.