

보건분야-연구자료
연구원 99-48-118
H-RD-I-99-48-118

유해인자별 생물학적 지표물질 개발에 관한 연구 (Ⅱ)

-유전자다양성 분석을 통한 평가 방법-

1998

한국산업안전공단
산업안전보건연구원

제 출 문

한국산업안전공단 이사장 귀하

본 연구결과를 1998년도 산업안전보건연구원의 연구사업 중 “유해인자별 생물학적 지표물질 개발에 관한 연구(II)”에 대한 최종결과보고서로 제출합니다.

1998년 12월 31일

주관 연구부서 : 산업안전보건연구원 직업병연구센터

연구책임자 : 책임연구원 김 기 웅

공동연구자 : 위촉연구원 박 상 신

소 장 강 성 규

선임연구원 이 관 형

연구원 김 태 균

손 남 석

정 효 석

목 차

Abstract	1
I. 서 론	3
1. 연구배경	3
2. 연구목적	6
II. 연구방법	8
1. 연구대상	8
2. 연구방법	8
1) 공기중 Benzene, Toluene 및 Xylene의 노출 농도	8
2) 대사산물의 뇨중 배설량	9
3) 혈액 lymphocytes 분리	9
4) 면역항체 분석	9
5) CYP1A1 유전자다양성 분석	10
6) Cloning 및 DNA 염기서열 확인	10
7) 자료분석	11
III. 연구결과	12
1. 연구대상자의 일반적 성질	12
2. 기중 Benzene, Toluene과 Xylene의 농도 및 이들 유기용제의 뇨중 대사산물의 농도	12

3. 단일세포성향체 분석	16
4. CYP1A1 유전자다양성 분석	17

IV. 고찰	24
--------------	----

V. 결 론	32
--------------	----

VI. 참고문헌	34
----------------	----

Development of Biomarkers for the Exposure Assessment of Hazardous Chemical

- Exposure assessment with genetic polymorphism -

Ki-Woong Kim, Seong-Kyu Kang, Tea-Kyun Kim, Hyo Seok Joung,
Nam-Seok Sohn, Kwanhyung Yi and Sang Shin Park

Center for Occupational Disease Research
Industrial Safety and Health Research Institute
Korea Industrial Safety Corporation

34-6, Kusan-dong, Pupyong-ku, Incheon 403-120, Korea

- Abstract -

Cytochrome P-4501A1 (CYP1A1) has been shown to be polymorphic in humans and responsible for the individual differences in hazards to cigarette smoking and polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs). In order to develop the methods for exposure assessment and find susceptibility markers for the industrial workers who were exposed to low doses of benzene, toluene, xylene and other chemicals such as PAHs in petroleum industries, Msp I polymorphisms of CYP1A1 were studied for 289 controls and 225 workers exposed to organic solvents. They could be classified into three types (A, B and C) depending on their CYP1A1 genotypes. The genotypes were determined by restriction fragment length polymorphism (RFLP) of genomic DNA amplified by polymerase chain reaction (PCR). The frequencies of CYP1A1 genotypes A, B and C for the control group (general population) were 33.58%, 56.34% and 10.07% and 41.52%, 47.32% and 11.16% for the exposed group, respectively. The differences in frequencies between the exposed group and control group were not statistically significant ($p>0.05$). The appearance ratios of CYP1A1 genotypes of control group to exposed group were not affected by

the amount of smoking (day/cigarettes) and duration of smoking and working ($p>0.05$).

These results suggested that the differences in exposure levels to organic solvents, determined by CYP1A1 expression were simple reflection of the degree of the gene expression. The mean concentrations of benzene, toluene and xylene in the air near the workplaces were less than 1/100th of the time weight average (TWA) level and the mean concentrations of metabolites for the solvents, such as phenol, hippuric acid and methyl hippuric acid were also low and less than 1/10th of the biological exposure index (BEI) recommended by the Labor Ministry of Republic of Korea. Thus, the studies on CYP1A1 genotypes with respect to susceptibility for the workers exposed to hazardous chemicals should be further investigated for high, low and all levels of exposure to organic solvents.

Key words : Benzene, Toluene, Xylene, Human lymphocytes, Metabolites, Cytochrome P-4501A1 genetic polymorphism

I. 서론

1. 연구 배경

유해화학물질 및 환경오염물질 등과 같은 많은 이물질들(xenobiotics)이 체내에 흡입되면 체내의 항상성조절 인자 즉, 이물질 대사 효소들에 의해서 일련의 대사 과정을 거치게 된다. 흡수된 물질의 대사과정을 살펴보면, 먼저 phase I 효소들의 산화-환원 작용에 의하여 활성화된 대사 중간체(activated metabolites)와 비활성화된 대사 중간체(inactivated metabolites)로 대사변형이 이루어지며, 대사 중간체 형성 과정의 변화에 따라서 해독화(detoxification) 과정과 독성유발 과정의 경로를 겪게된다. Phase I 효소에 의해서 대사 변형된 중간체의 대부분은 phase II 효소 및 제 3의 효소로 불리어지는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 제거효소(scavenger enzymes)들의 작용에 의해서 해독화 과정을 거쳐서 체외로 배설된다. 그러나 흡수된 본래의 물질 보다 극성과 반응성이 큰 활성화된 대사 중간체의 일부가 체내의 핵산 및 단백질들과 같은 거대분자들(macro molecules)과 공유결합을 통하여 독성을 유발시킨다(Hinson과 Pumford, 1995). 독성발현 기관(organ)의 독성유발 정도는 노출물질의 물리, 화학적인 성질과 노출형태에 따라서 많은 차이를 보인다. 따라서 우리 나라를 포함하여 전 세계적으로 유해화학물질의 대사, 독성발현 기전 및 건강장해에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다(Moretto와 Lotti, 1990; Melin 등, 1996; Yamamoto 등, 1997; Sinjari 등, 1998). 그러나 사람의 사고 형태가 양(quantity)보다는 질(quality)적인 변화를 추구하고 그에 따른 욕구를 충족시키기 위한 목적, 과학과 산업의 발달 등으로 인하여 새로운 화학물질의 합성과 생산량이 매년 증가하고 있어, 직업으로 기인한 근로자들의 노출도 한층 증가될 것으로 보인다. 따라서 이들 화학물질에 대한 독성 및 유해성 평가가 절실히 요구된다. 특히, 산업체 전반에 걸쳐서 사용되고 있는 화학물질 중 유기용제는 휘발성이 크고 피부접촉에 의해 체내 흡수가 빠르기 때문에 유기용제에 의한 근로자들의 건강장해와 독성발현 정도를 평가할 수 있는 방법의 개발이 시급하다고 생각된다. 산업체 근로자들이 직업과 관련하여 기인되는 질병의 예방과 건강보호를 위해서는 작업과정에서 발생하는 유해화학물질의 종류와 노출농도에 대한 작

업환경 평가와 체액(혈액 및 소변 등)을 이용한 생물학적 모니터링이 이루어져야 한다. 유해화학물질의 노출로부터 질병이 발생하는 과정을 단계별로 구분하여 설명하기는 매우 어렵다. 그러나 유해화학물질의 노출에 의한 질병의 발생과정에서 모니터링을 할 수 있는 단계는 노출농도와 체내 흡수량 평가 단계와 질병유발 가능성을 평가하는 단계로 구분할 수 있으며, 질병유발 가능성을 평가하는 단계는 다시 세 단계로 구분할 수 있다. 먼저 체내의 흡수 정도를 평가하는 단계와 생물학적 변형단계, 즉 전구물질의 손상과 그로 인한 adducts의 형성단계, 그리고 마지막으로 항상성 조절 인자 및 유전자 손상 등으로 인하여 이들의 구조가 변형되는 단계로 나눌 수 있다(Hulka 등, 1990). 따라서 유해화학물질의 노출에 의한 질병유발 가능성을 평가할 수 있는 생물학적 지표(biological markers)로는 노출에 대한 생물학적 지표(biological markers of exposure), 신체의 영향에 대한 생물학적 지표(biological markers of effect)와 민감성(감수성)에 대한 생물학적 지표(biological markers of susceptibility) 등 3가지로 세분할 수 있다(National Research Council, 1989). 먼저, 노출에 대한 생물학적 지표는 체액에서 노출물질의 흡수량을 측정한 후 생물학적 노출지표(biological exposure indices, BEI)에 적용하여 평가하는 방법이다. 이러한 생물학적 지표는 현재 산업보건 분야에서 널리 사용되고 있는 방법이다. 그러나 이러한 방법은 단지 노출과 체내 흡수에 대한 평가에 사용될 뿐 체내에서 일어나는 항상성 조절인자들의 변화나 기타의 신체 영향에 대해서 평가하기에는 다소의 어려운 점이 있다고 생각된다. 생물학적 지표 중 다른 하나는 신체가 노출물질에 의해서 영향을 받거나 받을 가능성이 있는가를 평가하는 방법이다. 즉, 외부로부터 흡수된 물질의 정도에 따라서 자기 방어시스템 기능의 변화가 일어나고, 그로 인하여 질병을 유발시킬 수 있는 물질들의 생성량 증가와 이들 물질을 제거할 수 있는 능력의 한계로 체내의 항상성 조절 기능의 불균형을 초래하는데, 이러한 기능의 불균형을 평가하고자 하는 방법이다. 현재 이러한 생물학적 지표 개발 연구로서는 특이성과 선택성이 뛰어난 수용체(receptor)와 면역항체에 미치는 영향 및 adduct의 생성량 등에 대한 연구가 이루어지고 있다. 또한 지난 30여 년간 생화학 및 분자생물학의 급격한 발전으로 인하여 유전자의 구조 및 기능 등에 대한 정보와 이해로 유전자 결함에 의한 질병이라든지 유해화학물질의 노출에 의한 질병발생 기전 등에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다(Marcel과 Grausz, 1997; Li 등, 1997; Kiyohara 등, 1998). 따라서 흡수

된 물질의 대사에 관여한다든지 영향을 받을 가능성을 가지고 있는 효소들에 대한 유전자다양성(genetic polymorphism) 분석을 통하여 유전자 형태에 따른 흡수 물질에 대한 대사능력의 개인차를 평가하고 직업으로 기인되는 질병발생과 유전자다양성의 차이에 따른 민감성(감수성) 연구가 이루어지고 있다(Goldstein, 1996). 그러나 유해화학물질의 노출과 체내의 영향을 정확히 평가하기 위해서는 위에서 기술한 몇 가지 방법 중 어떠한 생물학적 지표물질이든지 중복성은 적고, 특이성과 선택성은 커야 한다. 아무리 선택성과 특이성이 크다고 하더라도 중복성을 가지고 있다면 단지 단일물질의 노출에 대한 평가만을 할 수밖에 없다. 그러나 산업체에서 근로자들이 노출되는 유해화학물질은 대부분 복합된 형태로 노출되고 있다. 따라서 많은 연구자들은 단일물질에 노출될 경우와 복합물질의 형태로 노출될 경우에 있어서 대사능력 및 배설속도의 차이, 체내에서 흡수된 물질 및 대사 중간체간의 상호작용 등에 관하여 연구를 수행하고 있으며, 그에 따른 독성발현의 차이 및 특이성이 큰 생물학적 지표물질 개발에 많은 관심을 가지고 있다.

2. 연구목적

본 연구는 노동부의 선진화 3개년 연구사업과 과학기술부가 주관하는 해외고급과 학두뇌초빙활용(brain pool)제도와 관련하여 연차적으로 수행되어진 연구이다. 1차년도 연구('96.1부터 '96.12월)에서는 산업체에서 널리 사용되는 benzene, toluene, xylene 및 styrene 등과 같은 단일고리탄화수소(monocyclic aromatic hydrocarbons, MAHs)계 유기용제를 단일, 병합 및 혼합된 형태로 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐에 노출시킨 후 어떤 형태의 cytochrome P-450 (CYP)의 동위효소가 유도되는지를 단일 세포성 항체를 이용하여 *in vivo* 실험을 통하여 확인하였다. 그 결과, benzene과 저농도의 toluene 노출에 의해서는 CYP2E1 동위효소가 유도되며, 고농도의 toluene, xylene과 styrene에 의해서는 CYP2B1/2 동위효소가 유도되는 것을 확인하였다. 또한 toluene과 xylene, toluene과 benzene의 병합투여 군에서는 CYP 의존성 촉매 효소들의 활성도가 단일 투여군에서 보다 통계학적으로 유의한 감소를 보인 반면, 단일세포성항체를 이용하여 면역항체분석을 한 결과는 병합 투여군에서 유도된 단백질의 양이 단일 투여군에서 보다 현저히 증가하였다(김기웅 등, 1996). Nakajima 등 (1997)은 toluene이 benzylalcohol, o-cresol과 p-cresol로 대사되는데 CYP1A2, CYP2B6 및 CYP2E1 동위효소가 관여한다고 보고하였다. 따라서 우리는 benzene, toluene과 xylene을 취급하는 근로자들에 있어서 생물학적 지표물질들을 개발하고자 단일세포성항체를 이용하여 CYP의 특정한 동위효소들이 이들 유기용제에 의해서 유도, 발현되는지를 확인하고 동위효소의 발현 정도를 가지고 노출을 평가하는 방법으로 사용할 수 있는가를 보기 위하여 2차년도('97.1월부터 '97.12월) 연구과제로 선정하여 수행하였다. 2차년도 연구에서는 1차년도 연구결과를 토대로 CYP1A1/2, CYP2B1/2 및 CYP2E1에 대한 단일세포성항체를 이용하여 저농도의 benzene, toluene 및 xylene에 노출되는 근로자들의 혈액 림포사이트에서 이들 동위효소 발현의 정도를 정량화 하였다. 연구대상 근로자들이 노출되는 유기용제의 농도는 노동부가 고시한 8시간 시간가중평균치(time weight average, TWA)의 약 1/100 수준이었으며, 노출농도와 체내 흡수량을 대변하는 이들 유기용제의 뇨중 대사산물의 배설량은 생물학적 노출 지표(biological exposure index, BEI)의 1/10 수준이었다. 그러나 특정한 형태의 CYP 단일세포성항체를 이용한 면역항체실험에서는 대조군에서 보다 노출군에 있어서 발현된 CYP1A1/2, CYP2B1/2 및

CYP2E1 동위효소의 단백질 함량이 현저하게 증가하였음을 볼 수 있었다(김기웅 등, 1997). 그러나 이상의 연구는 단백질의 변화만을 가지고 평가한 연구로서 개개인에 따른 유전자 조성의 차이 및 기타의 음식물 섭취, 기호식품 등의 영향을 고려하지 못한 제한점을 가지고 있다. 따라서 금번 연구에서는 개개인에 따른 감수성과 기호식품, 즉 흡연 등에 의한 영향을 보완하기 위하여 특정한 형태의 CYP 동위효소의 유전자다양성(genetic polymorphism)과 저농도의 benzene, toluene 및 xylene에 장기간 노출될 경우에 있어서 이들 유기용제의 대사산물 및 CYP 동위효소 단백질의 발현과 어떠한 상관성이 있는가를 검토하는 것이 연구의 목적이다. 본 연구에서 나타난 결과는 유기용제의 노출에 의해서 야기되는 건강장애에 대한 개인간의 차이를 이해함으로써 근로자들의 건강장애를 예방하는데 큰 도움이 될 것으로 생각된다.

II. 연구방법

1. 연구대상

본 연구의 대상은 석유화학 산업체에서 저농도의 benzene, toluene 및 xylene에 노출되는 남성 근로자 225명을 노출군으로 하였다. 대조군은 노출군의 성(sex)과 연령을 고려하여 benzene, toluene 및 xylene 뿐만 아니라 기타의 유해화학물질에 노출되지 않는 사무직 근로자 289명을 대상으로 하여 총 514명이었다. 연구대상자 중 설문지 작성에 문제가 있는 대조군 대상자 21명과 DNA 추출과정에 문제가 있던 노출군 대상자 1명을 제외한 492명에 대하여 CYP1A1에 대한 유전자다양성을 분석하였다. 또한 이 형태의 유전자는 유해화학물질 뿐만 아니라 흡연, 질병 및 습관성 약물복용 등에 의한 영향이 있으므로 사전에 작성된 설문지를 이용하여 조사하였다.

2. 연구방법

1) 공기중 Benzene, Toluene 및 Xylene의 노출 농도

Benzene, toluene, xylene의 공기중 농도 측정은 미국 국립산업안전보건연구소(National Institute for Occupational Safety and Health, NIOSH)의 공정시험법(method 1501) 및 노동부 고시(제95-25호)에 준하여 실시하였다.

작업내용에 따라 임의로 작업자를 선정, 작업자의 호흡구 위치에 활성탄을 흡착물질로한 개인시료 포집기(Personal air sampler, Gillian, USA)를 부착하여 공기중의 benzene, toluene 및 xylene을 포집하였다. 개인시료 포집기의 포집유량은 0.2 ml/min으로 하여 8 시간 동안 포집한 후, 유기용제를 포집한 활성탄관의 양쪽을 플라스틱 마개로 봉하고 나서 실험실로 옮긴 후, 흡착제에 이황화탄소(CS_2) 1 ml를 첨가하여 탈착시켜 가스크로마토그래피(Gas Chromatography, Hewlett Packard HP 5890 II, USA)를 사용하여 분석하였다(NIOSH, 1984).

2) 대사산물의 뇨중 배설량

노출군의 뇨는 교대시간 30분 전에(end of shift) 채취하여 냉동시킨 후, 냉동상태로 실험실로 신속히 운반하여 benzene, toluene, xylene의 대사산물을 측정하였다. Benzene의 대사산물인 phenol의 배설량은 가스크로마토그래피를 이용하여(NIOSH, 1984), toluene과 xylene의 대사산물인 마뇨산(hippuric acid)과 메틸마뇨산(methyl hippuric acid)은 고성능액체크로마토그래피를 이용하여 NIOSH 공정시험법(NIOSH, 1984)에 준하여 분석하였다. 측정된 결과는 뇨중 creatinine으로 보정하였다.

3) 혈액 lymphocytes 분리

전혈 2 cc를 취하여 생리식염수(0.9% NaCl) 2 ml와 혼합한 후, lymphocyte 분리용 시약(Ficoll-Paque, USA) 3 ml를 첨가하여 2,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 lymphocyte층을 분리하였다. 분리된 lymphocyte 층에는 lymphocyte 이외의 혈액성분이 포함되어 있으므로 그러한 성분을 제거시키기 위하여 생리식염수를 첨가한 다음 1,000 rpm에서 원심분리 하였다. 분리된 lymphocyte는 homogenizer를 이용하여 파괴시켰고, 그 homogenates는 단백질 정량과 면역항체 반응에 의한 CYP1A1/2, CYP2B1/2와 CYP2E1 동위효소의 함량을 측정하는데 이용하였다.

4) 면역항체 분석

Dot blot kit에 Millipore 사 (Bedford, MA, USA)의 Immobilon-P nitrocellulose membrane을 장착한 다음, 분리된 혈액 lymphocyte homogenates를 dot blot kit에 loading(6 μ g) 한 후 4 $^{\circ}$ C에서 24 시간 동안 정치시켜 Immobilon-P nitrocellulose membrane에 단백질을 결합시켰다. 그런 다음 TROPIX 사 (Bedford, MA, USA)의 Western Light-PlusTM kit 시약을 이용하여 membrane에 단백질이 결합되지 않은 부분을 blocking 시킨 후 PBS buffer를 사용하여 씻어내고 CYP1A1/2, CYP2B1/2와 CYP2E1 동위효소에 대한 단일세포성항체를 blocking buffer에 희석시켜 실온에서 2 시간 동안 반응시킨 다음, washing buffer로 세척 하였다. 2차 항체반응은 alkaline phosphatase가 conjugation된 goat antimouse antibody를 blocking buffer에 희석한 다음, 실온에서 1 시간 동안 반응시키고 washing buffer를 이용하여 세척한 후 chemiluminascent 기질과 반응시킨 다음, x-ray film에 노

출시켜 나타난 흑색반점의 강도를 Densitometer (Hitach, Japan)를 이용하여 측정하고 표준검량곡선에 의하여 CYP 동위효소의 단백질 함량을 계산하였다.

5) CYP1A1 유전자다양성 분석

연구 대상자로부터 채혈한 전혈(whole blood)을 QIAamp Blood Kit(Qiagen, Germany)을 이용하여 genomic DNA를 추출하였다.

추출한 genomic DNA를 P1(5'-AGACAGGGTCCCCAGGTCAT-3')과 P2(5'-CAACTACTCAGAGGCTGAGGT-3') primers를 이용하여 CYP1A1 유전자의 3'-flanking region의 특정한 부분을 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 통하여 증폭시킨 후, Msp I 제한효소의 절단부위의 존재 유무를 가지고 유전자다양성 분석을 실시하였다. CYP1A1에 대한 유전자다양성 분석은 Okada 등(1994)의 방법을 다소 변형하여 다음과 같은 조건하에서 실행하였다. 200 μ l Thin wall tubes(BIO-RAD 제품)에 10X buffer 5 μ l, dNTP(2.5 mM) 5 μ l, Taq polymerase(5 unit/ μ l) 0.5 μ l를 가하고 5 pmol primer 1(P1)과 primer 2(P2)를 각각 2.5 μ l씩 넣고, genomic DNA 0.15 μ g을 첨가하고 증류수 29.5 μ l를 가하여 최종 부피를 50 μ l로 하였다. 반응 혼합물의 증발을 방지하기 위하여 mineral oil 10 μ l를 첨가한 후 gene cyclerTM(Bio-Rad, USA)를 이용하여, 94 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 predenaturation 시키고, 94 $^{\circ}$ C에서 1분 denaturation, 65 $^{\circ}$ C에서 1분 동안 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 extension 하여, 이 세 단계를 1 cycle로 하여 30 cycles을 수행하여 genomic DNA를 증폭시켰다. PCR 생성물을 Msp I 제한효소를 이용하여 digestion 시킨 후 2.0% agarose gel 전기영동을 실시하고 전개된 띠를 관찰하여 유전자다양성을 확인하였다.

6) Cloning 및 DNA 염기서열 확인

CYP의 특이적 primers로 수행한 PCR 생성물을 2.0% agarose gel에서 전기영동을 수행하고, Gene clean kit(Bio101, USA)을 이용하여 증폭된 DNA 단편을 수거한 후, PCR cloning vector인 pGEM-T plasmid (Promega, USA)에 cloning 하였다. pGEM-T plasmid에 cloning된 CYP1A1 유전자 단편의 염기서열은 SequenaseTM version 2.0 kit (USBTM Amersham, USA)을 사용하여 확인하였다. 먼저, CYP1A1 유전자 단편이 cloning된 plasmid 4 μ g을 T7과 SP6 primer로

sequencing 반응액을 만들어서 8 mol urea를 전개액으로 하여 8% polyacrylamide gel에서 전기영동을 실시한 후 gel을 건조시키고 x-ray film에 감광시켜 염기서열을 확인하였다.

7) 자료분석

조사대상자에 대한 자료는 개인용 컴퓨터를 이용하여 입력한 후 SAS 통계 프로그램을 이용하여 t-test, X^2 -test 및 ANOVA 등 자료분석을 하였다.

III. 연구결과

1. 연구대상자의 일반적 성질

연구대상자는 총 514명으로서 전부 남성 근로자였다. 대조군의 경우 289명으로 평균연령이 37.6 ± 7.6 세로서 29세 이하가 21.1%, 30에서 39세가 50.9%이며 40세 이상은 28.0%이었다. 이들 근로자중 흡연자는 62.7%이며 음주자는 90.7%이었다. 노출군의 경우는 대상자가 225명으로 평균연령은 35.6 ± 7.1 세였고, 이들 중 29세 이하가 31.6%, 30에서 39세가 38.6%이었으며 40세 이상은 29.8%이었다. 또한 이들 근로자에 있어서 64.1%가 흡연자였으며 음주자는 91.1%로 대조군과 노출군간에 있어서 흡연, 음주, 나이 및 습관성 약물복용 등에 대한 통계학적인 차이는 없었다($p > 0.05$).

2. 기중 Benzene, Toluene과 Xylene의 농도 및 이들 유기용제의 뇨중 대사산물 농도

연구대상 사업장의 근로자들은 작업의 특성에 따라서 현장 근로자와 사무실 근로자(실내 작업자)로 구분할 수 있다. 현장 근로자들의 작업형태는 일정한 시간 간격으로 분할된 특정지역을 순회하면서 작업현장을 감시하고 시료를 채취하는 작업을 수행하고 나머지 시간은 현장 사무실에서 상주하고 있었다. 실내 작업자는 현장 사무실에 설치된 공정 감시용 제어판 상황을 관찰하면서 작업의 흐름과 공정의 이상 유,무를 감시하는 작업을 한다. 연구대상 산업체인 D사와 L사는 원유(crude oil)로부터 benzene, toluene 및 xylene 등의 유기용제를 추출하는 회사로서 두 회사의 작업형태는 동일하다고 볼 수 있다. 이들 두 회사의 근로자들이 노출되는 benzene, toluene 및 xylene의 농도는 노동부 고시(1992)에 정한 1일 8시간 작업 시간가중평균치의 100분의 1수준인 매우 낮은 농도로 측정되었다(Table 2).

Table 1. General Characteristics of subjects

Items	Control (n=289)	Exposed (n=225)	Statistical Significance
Age(males)			N.S
>29	61(21.1)	71(31.6)	
30-39	147(50.9)	87(38.6)	
40<	81(28.0)	67(29.8)	
Smoking status			N.S
No	107(37.3)	79(35.9)	
Yes	180(62.7)	141(64.1)	
Smoking amount (cigarettes/day)			N.S
No	107(37.3)	79(35.9)	
>20	72(25.1)	70(31.8)	
20<	108(37.6)	71(32.3)	
Drink			N.S
No	27(9.3)	20(8.9)	
Yes	262(90.7)	205(91.1)	

Table 2. Mean values of benzene, toluene and xylene in air of workplace

Organic solvents (ppm)	D Company		L Company	
	FW (n=11)	IW (n=8)	FW (n=39)	IW (n=13)
Benzene	0.0346** (ND-0.315)	0.0002 (ND-0.012)	0.015 (ND-0.117)	0.012 (ND-0.049)
Tolene	0.0031* (ND-0.036)	0.0003 (ND-0.005)	0.010 (ND-0.454)	0.007 (ND-0.018)
Xylene	0.0003 (ND-0.001)	0.0003 (ND-0.001)	0.030* (ND-1.231)	0.002 (ND-0.037)

Values represents mean $\pm$ S.D.

FW, field workers and IW, indoor workers.

Figures in parentheses indicate measurment ranges.

*, ** : Significantly different from indoor worker(*: $p < 0.05$ and **: $p < 0.01$)

ND : Non detection

Source : 김기웅 등. 산업안전보건연구원연구보고총람 1997;6:575-589

또한 이들 근로자들에 있어서 benzene, toluene 및 xylene의 노출에 대한 생물학적 모니터링 지표인 뇨중 대사산물의 평균 배설량을 측정한 결과, benzene과 toluene의 대사산물인 뇨중 phenol과 마노산은 생물학적 노출지표의 약 10분의 1 정도의 낮은 수준으로 측정되었다. 그러나 뇨중 phenol의 배설량은 노출군에서 보다 대조군(9.44 mg/g Creatinine)에서 통계학적으로 유의한 증가를 보였으며 ($p < 0.05$), xylene의 대사산물인 메틸 마노산은 대조군과 노출군 모두에 있어서 검출이 되지 않았다(Table 3). 이러한 결과는 공기중 benzene, toluene 및 xylene의 노출농도 측정 결과에서 나타난 바와 같이(Table 2) 매우 낮은 농도에 노출됨으로써 나타난 결과로 보인다.

Table 3. Mean concentration of urinary metabolites

Metabolites	Exposed workers				Control workers
	D Company		L company		Officers (n=82)
	FW (n=39)	IW (n=41)	FW (n=99)	IW (n=46)	
Phenol	4.57±6.64 (ND-28.4)	5.91±6.85 (ND-40.8)	7.65±11.13 (ND-35.7)	5.71±7.89 (ND-78.2)	9.44±9.06* (ND-20.4)
Hippuric acid	0.24±0.36 (ND-0.6)	0.21±0.36 (ND-1.5)	0.24±0.27 (ND-1.5)	0.20±0.23 (ND-1.0)	0.24±0.26 (ND-0.75)
Methyl-hippuric acid	ND	ND	ND	ND	ND

Values represents mean±S.D. FW, field workers and IW, indoor workers.

Biological exposure index(BEI) : Phenol, 50 mg/g Creatinine; Hippuric acid, 2.5 g/g Creatinine; Methyl-hippuric acid, 1.5 g/g Creatinine.

*: Significantly different from exposed groups(D company and L company), $p<0.05$

ND : Non detection

Source : 김기웅 등. 산업안전보건연구원연구보고총람 1997;6:575-589

3. 단일세포성향체 분석

Benzene과 toluene은 CYP2E1과 CYP2B1/2 동위효소를 선택적으로 유도시키며, 유도된 이들 동위효소에 의해서 benzene과 toluene이 대사되며, xylene은 CYP2B1/2 동위효소를 유도시키는 것으로 보고되었다(Nakajima 등, 1992; 김기웅 등, 1996). 따라서 우리는 이들 유기용제에 노출되는 근로자들의 혈중 lymphocytes를 분리한 후 CYP 단일세포성향체를 이용하여 유도된 특정한 형태의 CYP 동위효소를 화학발광물질(chemiluminescence)에 의한 Dot blot 분석을 통하여 유도의 정도를 확인하였다(Table 4).

대조군에 있어서 유도된 CYP1A1/2의 동위효소는 흰쥐 간장의 microsomal 단백질 10 ng 당 1.95 ng, 노출군에서는 2.82 ng이 측정되었으며($p<0.01$), CYP2B1/2 동위효소는 대조군에서 1.80 ng, 노출군에서는 2.33 ng이 측정되었다($p<0.05$). 또한 CYP2E1 동위효소는 대조군에서 1.09 ng, 노출군에서는 1.50 ng으로 두 군간에 통계학적인 차이를 보이지 않았으나 노출군에 있어서 대조군 보다 단백질의 함량이 증가되었다($p>0.05$).

Table 4. Levels of CYP isozymes in lymphocytes of human exposed with benzene, toluene and xylene by dot immunoblot assay

Groups	CYP contents (arbitrary unit)		
	1A1/2	2B1/2	2E1
Control (n=82)	1.95±2.01** (0.0-9.5)	1.80±1.57* (0.0-7.4)	1.09±1.78# (0.0-7.7)
Exposed (n=225)	2.82±2.42 (0.3-20)	2.33±1.69 (0.3-10.6)	1.50±2.11 (0.0-9.3)

Arbitrary unit: 1 unit corresponds to rat liver microsomal protein(10 ng) exposed to the each CYP inducer.

Values represents mean±S.D.

Figures in parentheses indicate measurment ranges.

Significantly different from exposed group (D company and L company):

** $p<0.01$; * $p<0.05$; and # $p<0.1$.

Source : 김기웅 등. 산업안전보건연구원연구보고총람 1997;6:575-589

4. CYP1A1 유전자 다양성 분석

유전자는 종(species), 인종 등에 따라서 많은 다양성의 차이를 보이는데, Hayashi 등(1991)은 일본 사람에 있어서 CYP1A1 유전자의 3'-flanking region에 Msp I 제한효소에 의한 절단 자리가 있음을 보고하였다(Fig. 1). 따라서 우리나라 사람의 혈액을 채혈하여 genomic DNA를 추출한 다음, 3'-flanking region의 특정한 부분의 유전자를 증폭시켜 DNA 염기 T가 C로 바뀔 때 따라 제한효소 Msp I의 절단 부위가 존재하거나 존재하지 않는 상태를 2.0% agarose gel 전기영동을 실시하여 유전자다양성을 확인하였다(Fig. 2). 유전자의 돌연변이는 방사성 물질 및 유해화학물질 등의 폭로에 의해서도 일어날 수 있다(Shields, 1993). 따라서 대조군과 노출군 근로자들의 혈액에서 genomic DNA를 추출하여 CYP1A1 유전자를 증폭시킨 후 2.0% agarose gel 전기영동을 실시한 결과, PCR 생성물의 크기는 112 bp였고 Msp I 제한효소를 이용하여 RFLP를 실시하여 71과 41 bp의 bands를 얻었다(Fig. 2). 우리나라 사람(대조군)에서 A(m1/m1) 형태는 33.58%, B(m1/m2) 형태는 56.34%이었으며 10.07%가 C(m2/m2) 형태였다. 노출군에 있어서는 A 형태가 41.52%, B 형태는 47.32%였고 C 형태는 11.16%로서 각각의 분포를 보였는데, 노출군에 있어서 A와 C 형태가 대조군에서 보다 다소 증가된 경향을 보였으나 통계학적으로 유의한 차이는 없었다(Table 5)($p>0.05$).

1 acaatccttc tattctagcc tgcattgagc ttgcatgctt gcataagagc ttaagaaacc
 61 attgatttaa tgtaataggg aaaattctaa cccaggtatc caaaaatgtg taagaacaac
 121 tacctgagct aaataaagat attgttcaga aaatcctata ggtggagatt tttgaaatca
 181 taaatgattc atcactcgtc taaatactca cctgaaccc cattctgtgt tgggttttac
 241 tgtagggagg aagaagagga ggtagcagtg aagaggtgta gccgctgcac ttaagcagtc
 301 tgtttgaggg acaagactct atttttgag acagggtccc caggctcatcc aggtctggagt

 361 gcactggtac cattttgttt cactgtaacc tccacct**cct** **ggg**ctcacac gattctccca

 421 cctcagcctc tgagtagttg gggccgccag acgccaccac agctttttt tttttttt
 481 ttttttttg tagagatggg gtttcacat gttgccagg ctggtctcaa actcctgagc
 541 tcaagtgatc cacctgcctc agcctcccaa agtgctggga ttacaggcat gagacaagac
 601 tcctaatacac tgtgctgtct tagcgccctc tctaacttat cacaaattga

C

Msp I

Fig. 1. CYP1A1 gene sequence in 3'-flanking region (Source: Hayashi et al., J Biochem 1991;110:407-411)

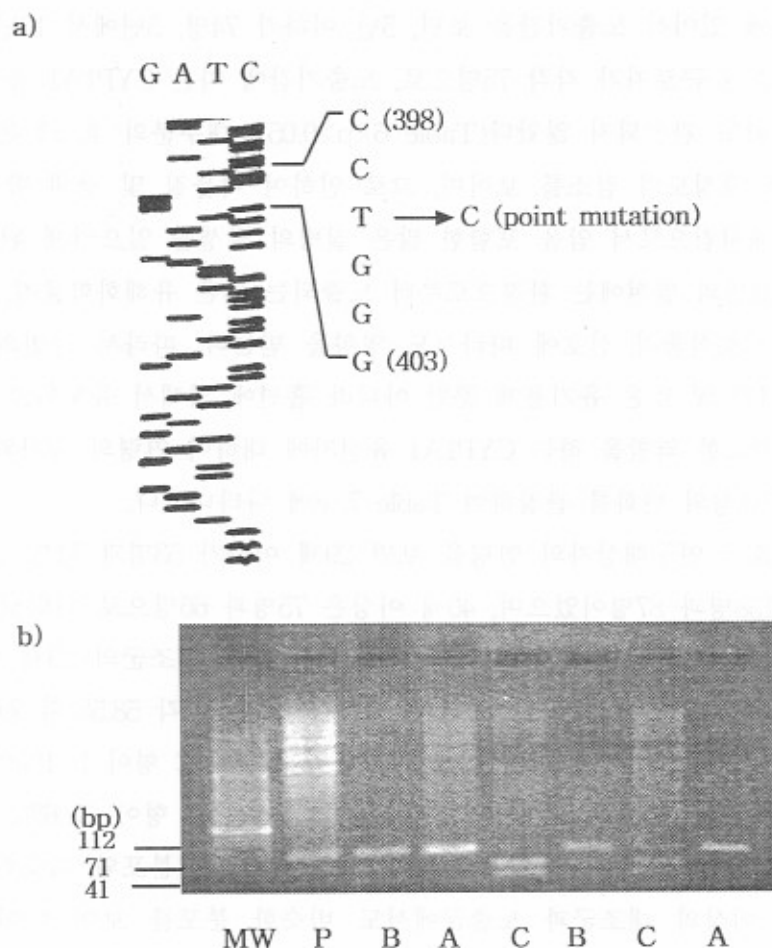


Fig 2. CYP1A1 mutation identified by DNA sequencing and analysis of CYP1A1 restriction fragment length polymorphism (RFLP) by PCR method. a) 400 T to C mutation. b) Amplified DNA by primers was digested with Msp I and analysed using 2.0% agarose gel electrophoresis. Allele m1 is absent from the Msp I site and m2 allele is present. Type A (m1/m1) and type C(m2/m2) are homozygotic and type B(m1/m2) is heterozygotic. MW, size marker and P, PCR product.

또한, 노출군에 있어서 노출기간을 보면, 5년 이하가 74명, 5년에서 10년 사이와 10년 이상 노출된 근로자가 각각 75명으로, 노출기간에 따른 CYP1A1 유전자다양성의 분포 차이도 관찰되지 않았다(Table 6)($p>0.05$). 대부분의 효소들은 연령의 증가에 따라서 활성도의 감소를 보이며, 그로 인하여 이물질 및 생체 합성물질들의 대사를 억제시킴으로서 암을 포함한 많은 질병의 발생을 일으키게 된다. 또한 암과 특이한 질병의 발현에는 환경으로부터 노출되는 많은 유해화학물질, 흡연 및 음주와 같은 기호식품의 선호에 따라서도 영향을 받는다. 따라서 금번의 연구에 있어서는 PAH계 및 많은 유기용제 뿐만 아니라 흡연에 의해서 유도되고 이들 물질의 대사에 중요한 역할을 하는 CYP1A1 유전자에 대하여 연령의 증가와 흡연에 의한 유전자다양성의 변화를 관찰하여 Table 7, 8에 나타내었다.

대조군과 노출군 연구대상자의 연령을 보면 29세 이하가 53명과 71명, 30세에서 39세 사이는 138명과 87명이었으며, 40세 이상은 75명과 66명으로 나타났다. 이들 대상자에 있어서 CYP1A1 유전자다양성을 분석한 결과, 대조군의 29세 이하에서 A 형(m1/m1)은 33.9%, B 형(m1/m2)과 C 형(m2/m2)은 각각 58.5%와 7.6%의 분포를 보였고, 노출군에서는 A 형이 33.8%, B 형이 52.1%, C 형이 14.1%의 분포를 보였으며, 30세에서 39세 사이에서도 대조군의 경우, A 형이 32.6%, B 형이 55.0%, C 형은 12.4%였으며, 노출군에 있어서도 대조군의 분포와 비슷한 결과를 보였다. 40세 이상의 대조군과 노출군에서도 비슷한 분포를 보여 나이에 따른 CYP1A1의 유전자다양성의 차이는 나타나지 않았으나($p>0.05$), 29세 이하의 연령군에서 대조군 보다 노출군 대상자들에 있어서 C 형태 유전자의 분포가 다소 증가된 경향을 보였다(Table 7). 담배는 연소과정에서 PAH계 물질뿐만 아니라 많은 화학물질이 발생되고, 이러한 여러 물질 중에서도 특히, 발암은 benzo(a)pyrene과 같은 PAH계 물질에 의해 유발된다. 특히, PAH계 물질들은 구조에 따라서 물리·화학적인 성질의 차이를 보이며 CYP1A1/2 동위효소를 선택적으로 유도시키고 유도된 CYP 동위효소의 작용으로 이들 물질의 대사가 이루어진다. 반면, 대사과정에서 생성된 활성화된 대사 중간체에 의해서 많은 유전자들의 특정한 부분에 돌연변이가 일어나기도 한다.

Table 5. Distribution of the three types of CYP1A1 gene restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) in control and workers exposed to monocyclic aromatic hydrocarbons

	CYP1A1 RFLP, cases (%)			Total
	A	B	C	
Control	90(33.58)	151(56.34)	27(10.07)	268(100)
Exposed	93(41.52)	106(47.32)	25(11.16)	224(100)

Table 6. Relationship between CYP1A1 gene restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) and working duration in workers exposed to monocyclic aromatic hydrocarbons

Working duration (years)	CYP1A1 RFLP, cases (%)			Total
	A	B	C	
< 5	34(45.9)	30(40.5)	10(13.5)	74(100)
5 - 10	29(38.6)	39(52.0)	7(9.4)	75(100)
10 <	30(40.0)	37(49.3)	8(10.7)	75(100)

따라서 금번 연구에서는 Msp I 제한효소를 이용하여 흡연자의 경우와 흡연자가 benzene, toluene 및 xylene 등의 유기용제에 노출될 경우 CYP1A1 유전자의 특정 부분에 절단 부위가 생기는지를 확인하였다. 흡연자의 경우, 3년 이상 계속해서 담배를 피우고, 1일 20개피 이하와 20개피 이상 피는 사람을 분류해서 CYP1A1 유전자다양성의 분포를 본 결과, 흡연과 흡연량에 따른 유전자다양성의 차이는 없었다($p>0.05$).

Table 7. Relationship between CYP1A1 gene restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) and age in control and workers exposed to monocyclic aromatic hydrocarbons

		CYP1A1 RFLP, cases (%)			
		A	B	C	Total
Age (Year)					
<29					
Control		18(33.9)	31(58.5)	4(7.6)	53(100)
Exposed		24(33.8)	37(52.1)	10(14.1)	71(100)
30-39					
Control		45(32.6)	76(55.0)	17(12.4)	138(100)
Exposed		40(45.9)	38(43.6)	9(10.5)	87(100)
40<					
Control		27(36.0)	43(57.3)	5(6.7)	75(100)
Exposed		29(43.9)	31(46.9)	6(9.2)	66(100)

Table 8. Relationship between CYP1A1 gene restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) and smoking level in control and workers exposed to monocyclic aromatic hydrocarbons

		CYP1A1 RFLP, cases (%)			
Smoking level (cigarettes/day)		A	B	C	Total
Non smokers					
	Control	35(35.7)	50(51.0)	13(13.3)	98(100)
	Exposed	28(35.9)	38(48.7)	12(15.4)	78(100)
Smokers					
<20(cigarettes/day)					
	Control	19(32.7)	34(58.6)	5(8.7)	58(100)
	Exposed	30(42.8)	33(47.1)	7(10.1)	70(100)
20< (cigarettes/day)					
	Control	32(31.7)	62(61.4)	7(6.9)	101(100)
	Exposed	32(45.0)	33(46.7)	6(8.3)	71(100)

IV. 고 찰

Benzene, toluene 및 xylene의 대사기전이 밝혀지면서(Park과 Williams, 1953; Ogata 등, 1970; Cohr와 Stockholm, 1979) 이들 유기용제의 대사에 관여하는 효소들의 작용, 약물동력학적(pharmacokinetics) 연구 및 독성현상에 대한 많은 연구가 활발히 수행되고 있다(Moretto와 Lotti, 1990; Nakajima 등, 1992; Tardif 등, 1992; Norpoth 등, 1996; Yu 등, 1998). 이들 유기용제 대사의 일차적인 단계는 망상조직 소포체의 microsomes에 존재하는 phase I 효소중의 하나인 CYP 의존성 촉매효소에 의해서 친수성 물질로 대사변형 된 후 reduced glutathione (GSH), glutathione S-transferase (GST), UDPG-glucuronyltransferase 등과 같은 phase II 효소들과 복합물을 형성하여 체외로 배설된다. 따라서 산업보건학적인 측면에서는 이들 유기용제에 대한 대사기전 연구를 토대로 하여 노출에 대한 생물학적 모니터링 방법으로 뇨 중으로 배설되는 최종 대사산물의량을 측정하여 평가하고 있다(이광목, 1981). 그러나 이러한 방법에는 다소의 문제점을 내포하고 있다. Sittert 등(1993)에 의하면 benzene의 노출 농도와 관련하여 저 농도의 benzene에 노출되는 근로자들에 있어서 뇨중 phenol의 배설량을 측정하여 생물학적 모니터링 지표로 사용하는데는 특이성이 떨어진다고 보고하였으며, 저 농도의 톨루엔에 노출될 경우에도 뇨중 phenol의 배설량 처럼 특이성이 낮다는 보고가 있다(ACGIH, 1986). 이러한 제한점 외에도 다른 문제점은 산업체 근로자들이 이들 유기용제에 노출될 경우에 단일물질 형태가 아니라 복합물질에 의한 노출이 대부분이라는 것이다. Aoki 등(1996)은 수컷 Wistar계 흰쥐를 대상으로 하여 2,5-hexanedione (2,5-HD), 2,5-HD와 acetone, 2,5-HD와 methyl ethyl ketone을 단일 및 복합투여 한 후, 시간에 따른 혈청의 2,5-HD의 농도는 복합투여 보다 2,5-HD 단일투여군에서 현저한 감소를 보였으며, 김기웅 등(1995)은 ethanol을 전 처리한 후 trichloroethylene을 투여군과 trichloroethylene 만을 투여한 군에서 CYP 의존성 전자-전달 계와 alcohol dehydrogenase의 활성도가 ethanol을 전 처리한 군에서 현저히 감소됨을 보고하였다($p < 0.05$). Ikeda 등(1972)은 toluene이 benzene의 대사를 억제하여 benzene의 독성작용을 상승시킬 수 있다고 보고하였으며, toluene과 benzene에 함께 폭로될 경우 benzene의 영향으로 마노산의 생성이 감소된다고 하였다(Tardif 등, 1992). 김기웅 등(1996)은 고 농도의 benzene, toluene 및 xylene을 Sprague

Dawley계 수컷 흰쥐에 2일간 연속해서 단일, 복합 및 혼합투여 한 후 이들 유기용제의 뇨중 대사산물의 배설량을 측정한 결과, 단일투여군에서 보다 복합 및 혼합투여군에서 대사산물의 배설량이 현저히 감소하였다고 보고하였다. 이와 같이 노출되는 형태의 차이와 노출농도의 수준에 따라서 대사산물의 배설량이 많은 차이를 보이기 때문에 보다 더 특이성이 큰 생물학적 지표물질을 개발하고자 국내, 외적으로 면역항체의 생성, 특히 수용체 개발, DNA-adduct 및 유전자다양성 분석 등 생화학 및 분자생물학적인 측면에서의 연구가 진행 중에 있다(AACR와 IARC, 1996; 김기웅 등, 1997). 따라서 우리는 2차년도('97.1 - 12.) 연구에서 단일세포성항체를 이용하여 저 농도의 복합 유기용제에 노출되는 근로자들에 대해 생물학적인 평가방법을 개발하고자 하였다. 연구대상 노출군 근로자들의 근무기간은 70% 정도가 5년 이상이었으며(Table 6), 노출되는 benzene, toluene 및 xylene의 기중 농도는 노동부 고시에 정한 TWA 의 100분의 1 수준이었으며(Table 2), 뇨중 대사산물의 배설량도 BEI의 10분의 1 정도로 대조군의 측정치와 통계학적으로 유의한 차이가 없었다(Table 3)($p>0.05$). 이상의 연구결과에서 나타난 바와 같이 노출군 근로자들이 저 농도의 benzene, toluene 및 xylene에 노출되고 있어서 뇨중 대사산물의 배설량이 대조군과 노출군간에 차이를 보이지 않은 것이며, 그러한 이유로 말미암아 대사산물의 배설량을 가지고 저 농도의 유기용제 노출에 대한 생물학적 모니터링을 실시하는 것은 특이성과 선택성이 매우 낮다고 볼 수 있다. 따라서 특이성과 선택성이 큰 면역항체 분석을 통하여 유기용제의 노출에 대한 생물학적 지표물질을 개발하고자, CYP 단일세포성항체를 이용하여 사람의 혈액 lymphocytes에서 이들 유기용제의 노출에 의해 유도된 특정한 형태의 CYP 동위효소의 단백질 함량을 chemiluminescent 기질을 이용하여 dot blot 분석 방법으로 측정하였다. CYP의 발현은 종(species), 성별(sex) 등과 같은 유전적인 요인(Nelson 등, 1996) 뿐만 아니라 흡연(Song 등, 1991), 알코올(Ko 등, 1987), 약물(Spatzenegger와 Jaeger, 1995) 및 화학물질(Nebert 등, 1978; Nakajima 등, 1992; 김기웅 등, 1997a)의 흡수 정도에 따라서 많은 차이를 보인다. 그러므로 설문지를 이용하여 CYP1A1/2, CYP2B1/2 및 CYP2E1 동위효소의 유도에 영향을 미칠 수 있는 외부적 인자인 음주, 흡연, 질병 상태 및 습관성 약물복용 등에 대한 혼란변수를 통제하고 나서, CYP1A1/2, CYP2B1/2 및 CYP2E1 단일세포성 항체를 이용하여 대조군과 노출군에 있어서 이들 CYP 동위효소의 유도된 단백질 함량을 측

정한 결과, 노출군에서 CYP1A1/2와 CYP2B1/2 동위효소의 유도가 대조군에서 보다 통계학적으로 유의하였으며($p < 0.01$, $p < 0.05$), CYP2E1의 경우는 통계학적으로 유의한 차이는 없었으나($p > 0.05$) 노출군에서 유도된 동위효소의 함량이 증가하였다(Table 4). 이러한 결과는 저 농도의 유기용제에 장기간 폭로됨으로서 자기방어적 측면에서 이들 유기용제 대사에 관여하는 CYP1A1/2, CYP2B1/2와 CYP2E1과 같은 효소의 발현에 의해서 단백질의 함량이 증가된 결과로 보인다. Fujino 등(1982)은 *in vitro* 실험을 통하여 CYP1A1 동위효소를 유도시키는 PAH계 물질인 benzoanthracene을 사람의 lymphocytes에 처리하였을 때, 처리하지 않은 군에서 보다 처리한 군의 lymphocytes에서 aryl hydrocarbon hydroxylase(AHH)의 활성도가 증가됨을 보고하였다. 이들의 연구와 우리가 수행한 연구는 실험방법과 처리물질의 차이가 매우 상이하지만 특정한 형태의 CYP 동위효소를 유도시킬 수 있는 물질에 노출시 CYP 동위효소의 발현이 일어난다는 결과는 같다고 볼 수 있다. 그러나 우리가 수행한 연구는 유기용제에 직접 노출되는 근로자를 대상으로 한 최초의 *in vivo* 실험으로서 그 의미가 매우 크다고 볼 수 있으며, 특이성과 선택성이 큰 면역항체를 이용하여 저 농도의 benzene, toluene 및 xylene 뿐만 아니라 많은 유해화학물질의 노출을 평가할 수 있다는 가능성을 제시하였다고 생각된다. 그러나 2차년도 연구에서는 유전적인 요인에 대한 영향을 평가하지 못하였다. 따라서 2차년도 연구 결과에서 나타난 바와 같이 benzene, toluene 및 xylene에 노출되는 근로자들의 혈액 lymphocytes에서 CYP1A1/2, CYP2B1/2와 CYP2E1 동위효소의 유도가 현저히 증가된 것이 단지 유기용제의 노출에 의해서 인지 아니면 유전적인 요인에 의해서 나타난 결과인지를 확인해야할 필요성이 있다. 그러므로 금번의 3차년도 연구에서는 유전자다양성 분석을 통하여 2차년도 연구에서 수행하지 못했던 유전적인 요인에 대한 연구를 실시하여 CYP 동위효소의 유도발현에 대한 개인간의 차이를 평가하여 susceptibility marker로 활용하고자 하였다. Gullsten 등(1997)은 중합효소연쇄반응을 통한 유전자다양성 연구에서 간경변이 있는 환자군에서 대조군 보다 CYP2A6 유전자의 wild type 동질접합체의 빈도가 많았다고 보고하였다. Kawajiri 등(1990)은 폐암과 관련하여 CYP1A1에 대한 유전자다양성 연구를 통하여 homozygous (m1/m1)와 heterozygous (m1/m2) 보다 m2/m2 homozygous 형태를 가진 사람이 폐암에 대한 위험성이 2.6에서 3.1 배정도 높으며, 특히 squamous cell carcinoma 환자에서 현저하였다고 보고하였으며,

squamous cell carcinoma의 발생은 흡연과 상관성이 있다고 보고하였다(Nakachi 등, 1991). Song 등(1985)도 흡연과 관련하여 여성의 태반과 lymphocytes에서 효소 및 면역항체실험을 통하여 비 흡연 여성 보다 흡연 여성에 있어서 유도된 CYP1A1/2 동위효소의 단백질 함량과 aryl hydrocarbon hydroxylase(AHH)의 활성도가 현저히 증가되었다고 보고하여 흡연과 CYP1A1/2 동위효소의 상관성이 매우 큼을 시사하고 있다. 따라서 금번 연구의 대상자들은 석유화학단지 내에서 benzene, toluene 및 xylene을 추출하는 작업을 수행하고 있지만 근로자들의 작업장이 석유화학단지 내에 위치하고 있으므로 이들 유기용제 뿐만 아니라 PAH계 물질의 노출도 가능하리라 생각되며, 그러한 가능성을 뒷받침하는 결과로 2차년도 연구에서 노출군 근로자들에 있어서 CYP1A1 동위효소의 유도가 CYP2B1/2 및 CYP2E1 보다 현저하였다($p < 0.01$). 그러므로 추후에는 CYP와 관련된 phase I 효소들의 유전자다양성 연구뿐만 아니라 phase II 효소군에 대한 유전자다양성의 연구를 연차적으로 수행해야 하겠지만, 금번 연구에서는 우선적으로 2차년도 연구결과를 바탕으로 하여 CYP1A1 유전자를 선택하여 유전자다양성 연구를 수행하였다. 연구 대상자는 대조군 268명과 노출군 224명으로 총 492명에 대하여 CYP1A1 유전자다양성 분석을 실시하였다. Hayashi 등(1991)이 일본 사람을 대상으로 하여 CYP1A1 유전자의 3'-flanking region에 Msp I 제한효소의 절단 위치가 있다는 연구를 참고로 하여(Fig. 1), Okada 등(1994)의 방법에 따라 혈액의 genomic DNA를 특정한 primers를 사용하여 PCR 방법으로 증폭시킨 후, 생성된 PCR products를 Msp I 제한효소로 절단시켜 2.0% agarose gel 전기영동을 실시하여 PCR 생성물의 크기는 112 bp였고, Msp I 제한효소에 의해서 절단된 DNA의 절편은 각각 71과 41 bp라는 것을 관찰하였다(Fig. 2). 또한, 제한효소에 의해서 생성된 절편의 크기와 Msp I의 절단 위치가 존재하는지를 알아보기 위하여 PCR products를 pGEM-T plasmid cloning vector로 cloning을 실시하여 8% polyacrylamide gel 전기영동으로 우리 나라 사람에 있어서 3'-flanking region에 Msp I 절단 위치가 있음을 확인하였다(Fig. 2). Msp I의 절단 부위가 존재하지 않으면 m1, 존재하면 m2로 하여 A 형(m1/m1), B 형(m1/m2) 및 C 형(m2/m2)으로 분류하였다. 직업적으로 이들 유기용제 뿐만 아니라 다른 유해화학물질에도 노출되지 않는 대조군에 있어서 A 형태는 33.58%, B 형태는 56.34%, C 형태는 10.07%로 각각의 분포를 보였으며, 노출군에서는 A 형태가 41.52%, B 형태가

47.32%, C 형태가 11.16%의 분포를 보여 두 군간에 통계학적인 차이는 없었다 (Table 5)($p>0.05$). 그러나 이들 유기용제를 포함한 많은 이물질들의 체내 흡수에 의한 독성발현은 흡수된 양과 흡수되는 기간에 의해서 결정되므로, 노출기간을 5년 이하, 5년에서 10년, 10년 이상으로 분류한 후, CYP1A1 유전자 다양성의 분포를 확인한 결과, 노출기간에 따른 통계학적인 차이도 관찰되지 않았다(Table 6)($p>0.05$). 이러한 연구 결과는 benzene, toluene 및 xylene에 저 농도로 노출되었기 때문에 체내의 이물질 대사 효소에 관여하는 유전자에 큰 영향을 미치지 않음으로서 나타난 결과라 생각된다. 따라서 이상의 연구결과를 가지고 확신할 수는 없지만 유기용제의 영향이 없다고 가정한 상태에서 대조군과 노출군 연구 대상자 전체를 한 집단으로 하여 우리 나라 사람에 있어서 유전자다양성의 분포를 보면, A 형태는 37.2%, B 형태는 52.2%, C 형태는 10.6%임을 알 수 있었다. Okada 등 (1994)은 일본 사람을 대상으로 하여 CYP1A1 유전자다양성 분석을 실시한 결과, A 형태가 44.3%, B 형태가 45.1%, C 형태가 10.6%의 분포를 보였다고 하였으며, Lee 등(1994)은 중국인 187명을 대상으로 하여 CYP1A에 대한 유전자다양성 분석을 실시한 결과, A 형태가 53%, B 형태가 37%, C 형태는 10%의 분포를 보임을 보고하였다. 이들의 연구결과와 우리의 연구 결과를 비교해 보면, 한국, 일본 및 중국인 연구 대상자 모두에 있어서 C 형태의 분포는 비슷하였지만, A와 B 형태는 다소의 차이를 보였다. 이러한 결과는 인종의 차이에 의해서 나타난 결과로 보여지나 추후에는 A와 B 형태의 유전자 차이가 이들 유기용제의 대사와 어떤 연관성이 있는지에 대한 연구도 필요하다고 본다. 체내에서 일어나는 이화 및 동화작용의 균형은 체내의 항상성을 유지하는데 있어서 매우 중요하며, 이러한 작용에는 많은 효소들이 관여한다. 그러나 이들 효소의 활성은 외부로부터 노출되는 물질 (Lu와 West, 1980; Koop 등, 1985; Umeno 등, 1988), 성별 및 나이 등에(Harman, 1986; Lee 와 Yu, 1990; Nakajima 등, 1992; Almeida 등, 1996; Mortensen 등, 1996) 따라 많은 차이를 보인다. 따라서 금번 연구에 있어서는 나이가 증가함에 따라 이물질 대사효소의 활성도가 감소됨으로서 외부로부터 흡입된 물질에 대한 해독작용(detoxification)과 면역능력의 저하가 유전자의 다양성에 어떠한 영향을 주는지를 보기 위하여 29세 이하, 30에서 39세 이하, 40세 이상으로 분류하여 관찰하였다. 그 결과, 대조군과 노출군 모두에 있어서 나이의 증가에 따라 통계학적으로 CYP1A1 유전자다양성 분포의 차이는 나타나지 않았다(Table 7)($p>0.05$). 또

한 CYP1A1 유전자는 유해화학물질의 노출뿐만 아니라 담배의 영향에 의해서도 특정한 부분의 염기가 point mutation을 일으켜 Msp I의 절단 부위를 가질 수 있기 때문에, 금번 연구에서 흡연 유. 무에 따른 유전자다양성의 차이를 보았다. 흡연자는 3년 이상 계속해서 담배를 피우고 있는 사람으로서 1일 20개피 이하와 이상으로 분류하여 측정을 실시하였다. 그 결과, 비흡연자와 흡연자 사이에서 유전자다양성의 차이는 없었으며($p>0.05$), 흡연자에 있어서 1일 피우는 담배의 양에 따른 차이도 나타나지 않았다(Table 8)($p>0.05$). Nakachi 등(1991)은 CYP1A1의 C 형태의 유전자를 가진 사람에 있어서 흡연에 의한 폐암 발생이 높다고 하였으며, Okada 등(1994)은 암의 종류 및 질병의 상태에 따라서 흡연이 질병의 진행속도를 빠르게 할뿐만 아니라, 암의 발생 및 진행속도의 결정이 담배의 연소과정에서 발생하는 발암물질인 benzo(a)pyrene과 같은 PAH계 물질에 의해서 이루어질 수 있으나 유해화학물질에 노출되지 않은 일반인의 경우에 있어서 흡연에 의해서 CYP1A1 유전자다양성의 차이는 보이지 않았다고 보고 하였다. 그러므로 금번 연구에서 대조군과 노출군, 비흡연자와 흡연자 및 노출군의 흡연자 등 각각의 경우에 CYP1A1 유전자다양성의 차이를 보이지 않은 이유는 저 농도의 유기용제에 폭로되기 때문으로 보인다. 그러나 유해화학물질에 의해서 발생하는 암을 포함한 많은 질병은 대사과정에서 생성되는 활성화된 대사 중간체에 의해서 유발된다. 따라서 추후에 고 농도의 benzene, toluene 및 xylene에 노출되는 근로자들에 있어서 CYP1A1 유전자다양성의 연구와 고 농도의 유기용제에 노출되며 담배를 피울 경우에 CYP1A1 유전자다양성은 어떠한 변화를 보이는지에 대한 평가 이루어지면, 이들 유기용제의 노출에 의해서 발생할 수 있는 질병에 대한 susceptibility marker로 이용할 수 있을 것으로 보인다.

이상의 연구에서 저 농도의 유해화학물질에 노출되는 근로자들에 대한 노출을 평가하는데 있어서 면역항체를 이용한 평가방법이 다른 방법 보다 특이성이 매우 크다는 것을 CYP 단일세포성항체를 이용하여 검정을 하였다. 그러나 면역항체 방법은 환경적인 요인뿐만 아니라 유전적인 요인에 의해서 많은 차이를 나타낼 수 있으므로, 금번 연구에서 대조군과 노출군 근로자들에 대하여 CYP1A1 유전자다양성 분석을 실시한 결과, 두 군간에 유전자다양성의 차이는 없었고 다만 면역항체 분석에서 차이를 보여, 면역항체 분석 방법을 이용하여 저 농도의 유해화학물질의 노출을 평가할 수 있는 생물학적 지표물질로 활용할 수 있을 것으로 보인다.

비록 금번 연구에서 대조군과 노출군 사이에서 유전자다양성의 차이는 없었으나 유전자다양성 분석을 통하여 유해화학물질의 노출에 따른 개인간의 대사능력 및 건강장해를 평가할 수 있는 susceptibility marker 개발의 토대가 되었다고 본다.

그러나 유해화학물질의 노출에 대한 체내의 영향은 복합적으로 이루어지기 때문에 추후에는 여러 가지의 항체 및 수용체를 이용한 평가방법의 개발과 phase I뿐만 아니라 phase II 효소 군에 대한 유전자다양성 연구를 통하여 개인에 따른 susceptibility maker를 개발해야 할 것으로 본다.

V. 결 론

1. 노출군에 있어서 benzene, toluene 및 xylene의 노출농도는 노동부 고시에 정한 1일 8시간 시간가중평균치의 약 100분의 1수준의 낮은 농도에 노출되고 있었으며, 이들 유기용제의 대사산물 배설량도 매우 낮은 농도로 측정되었으며, 대조군과 노출군간에 통계학적인 차이는 없었다($p>0.05$).
2. 혈중 lymphocyte에서 CYP1A1/2, CYP2B1/2 및 CYP2E1 동위효소에 대한 면역항체실험 결과, 노출군에서 유도된 단백질의 함량이 대조군에서보다 통계학적으로 유의한 증가를 보였다($p<0.01$, $p<0.05$).
3. 혈액에서 추출한 genomic DNA에서 CYP1A1 Msp I 유전자다양성을 분석한 결과, 대조군의 경우 type A(m1/m1)는 33.58%, type B(m1/m2)는 56.34%, type C(m2/m2)는 10.1%의 분포를 보였으며, 노출군에서는 A 형태가 41.52%, B 형태는 47.32%, C 형태에서는 11.16%를 두 군간에 통계학적인 유의한 차이는 없었다($p>0.05$).
4. 대조군과 노출군에 있어서 나이 및 흡연에 따른 CYP1A1 유전자다양성의 차이는 없었으며, 노출군의 경우 작업기간에 따른 차이도 없었다($p>0.05$).

이상의 실험결과를 보면, 대조군과 노출군간에 CYP1A1 유전자다양성의 차이는 없었으나 노출군 근로자들의 혈액 lymphocytes에서 CYP1A1/2, CYP2B1/2 및 CYP2E1 동위효소의 유도가 현저하였다. 이러한 결과는 저 농도의 유기용제 노출에 대한 생물학적 지표물질로 단일세포성항체를 이용하여 평가할 수 있음을 보여주고 있다. 금번 연구의 대상자들이 저 농도의 유기용제에 노출되기 때문에 유전자다양성의 차이가 나타나지 않은 것으로 볼 수도 있어 추후에 고농도의 유기용제 노출 근로자들에 대한 평가가 이루어져야 할 것으로 보인다. 또한 생화학 및 분자생물학적인 측면에서 이물질 대사에 관여하는 많은 효소들에 대한 면역항체, 수용체 및 유전자다양성분석 등을 통한 생물학적 지표물질의 개발이 필요하다고 본다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부에서 주관하는 '95년도 2차 해외고급과학두뇌초빙활용(Brain Pool) 사업(1995, 화공.생명과학분야(보건), 과제번호 4-17)과 관련하여 3년 동안('96. 1. 1. - '98. 12. 31) 수행한 연구의 일부분으로서 과학기술부, 한국과학재단 및 한국과학기술단체총연합회 등에서 도움을 주신 많은 분들에게 감사를 드립니다. 특히, 초빙과학자로 오셔서 본 연구에 참여하시고, 많은 도움과 조언을 주신 박상진 박사님께 진심으로 감사드립니다.

참고문헌

- 김기웅, 강성규, 조영숙, 이세희, 문영한, 최병순, 박상신. Ethanol이 trichloroethylene 대사효소의 활성도와 유도성에 미치는 영향. 예방의학 회지 1995;28:141-152
- 김기웅, 문영한, 박상신. 방향족 유기용제의 상호작용 및 대사에 관한 연구. 산업안전보건연구원 연구자료 1996
- 김기웅, 김양호, 박정선, 오세민, 양정선, 김태균, 손남석, 정효석, 문영한, 박상신. 유해인자별 생물학적 지표물질 개발에 관한 연구 (I). 산업보건 연구원 연구자료 1997
- 김기웅, 장성근, 정효석, 이준연, 문영한, 박상신. 흰쥐에 있어서 styrene에 의한 간장의 microsomal cytochrome P-450의 유도. 대한산업의학회지 1997(a);9:604-613
- 노동부 : 유해물질 허용농도. 서울, 노동부, 1992
- 이광목. 유기용제 폭로를 위한 biological monitoring. 한국의 산업의학 1981;20:1
- AACR and IARC. Carcinogenesis from environmental pollution: Assessment of human risk and strategies for prevention. Joint Conference of the American Association for Cancer Research and The International Agency for Research on Cancer with the collaboration of The Hungarian Cancer Society 1996
- ACGIH. Documentation of the threshold limit values and biological exposure indices. Cincinnati, Ohio, ACGIH, 1986
- Almeida VD, Camarini R, Azzalis LA, Junqueira VBC, and Carlini EA. Chronic fenfluramine treatment of rats with different ages: Effects on brain oxidative stress-related parameters. J Biochem Toxicol 1996;11: 197-201
- Aoki K, Zhao W, Misumi J, Yasui T and Kudo M. Changes in 2,5-hexanedione concentration in the sciatic nerve, serum and urine of rats induced by combined administration of 2,5-hexanedione with acetone or methyl ethyl ketone. J Occup Health 1996;38:30-35

- Cohr KH, Stokholm J. Toluene. A toxicology review. *Scand J Work Environ Health* 1979;5:71-90
- Fujino T, Park SS, West D, and Gelboin HV. Phenotyping of cytochromes P-450 in human tissues with monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:3682-3686
- Goldstein BD. Biological markers and risk assessment. *Drug Meta Rev* 1996;28:225-233
- Gullsten HG, Agundez JAG, Benitez J, Laara E, Landero JM, Diaz-Rubio M, Fernandez-Salguero P, Gonzalez F, Rautio A, Pelkonen O and Raunio H. CYP2A6 gene polymorphism and risk of liver cancer and cirrhosis. *Pharmacogenetics* 1997;7:247-250
- Harman D. In free radical, aging and degenerative disease. Alan R. Liss. New York, 1986, pp 3-49
- Hayashi S-I, Watanabe J, Nakachi K, and Kawajiri K. Genetic linkage of lung cancer-associated Msp I polymorphisms with amino acid replacement in the heme binding region of the human cytochrome P450IA1 gene. *J Biochem* 1991;110:407-411
- Hinson JA, Pumford NR. Mechanims of acetaminophen toxicity: Immunochemical detection of drug-protein adducts. *Drug Meta Rev* 1995;27:73-92
- Hulka BS, Wilcosky TC and Griffith JD. Biological markers in epidemiology. Oxford Univ. Press, 1990
- Ikeda M, Ohtsuji H, Imamura T. In vivo suppression of benzene and styrene oxidation by co-administrated toluene in rats and effects of phenobarbital. *Xenobiotica* 1972;2:101-106
- Kawajiri K, Nakachi K, Imai K, Yoshii A, Shinoda N, Watanabe J. Identification of genetically high risk individuals to lung cancer by DNA polymorphisms of the cytochrome P450IA1 gene. *FEBS Lett* 1990;263:131-133
- Kiyohara C, Nakanishi Y, Inutsuka S, Takayama K, Hara N, Motohiro A,

- Tanaka K, Kono S and Hirohata T. The relationship between CYP1A1 aryl hydrocarbon hydroxylase activity and lung cancer in a Japanese population. *Pharmacogenetics* 1998;8:315-323
- Ko I-Y, Park SS, Song BJ, Patten C, Tan Y, Hah YC, Yang CS, and Gelboin HV. Monoclonal antibodies to ethanol-induced rat liver cytochrome P-450 that metabolizes aniline and nitrosamines. *Cancer Research* 1987;47:3101-3109
- Koop DR, Crump BL, Nordblom GD, and Coon MJ. Immunochemical evidence for induction of the alcohol-oxidizing cytochrome P-450 of rabbit liver microsomes by diverse agents: Ethanol, imidazole, trichloroethylene, acetone, pyrazole, and isoniazid. *Proc Natl Acad USA* 1985;82:4065-4069
- Lee DW, and Yu BP. Modulation of free radicals and superoxide dismutase by age and dietary restriction. *Aging* 1990;2:357-362
- Lee EJD, Zhao B, Moolchhala SM, and Ngoi SS. Frequency of mutation CYP1A1, NAT2 and GSTM1 alleles in a normal Chinese population. *Pharmacogenetics* 1994;4:355-358
- Li W-F, Matthews C, Disteché CM, Costa LG, and Furlong CE. Paraoxonase (Pon-1) gene in mice: sequencing, chromosomal localization and developmental expression. *Pharmacogenetics* 1997;7:137-144
- Lu AYH, and West SB. Multiplicity of mammalian microsomes P-450. *Pharmacol Rev* 1980;31:277-295
- Marcel T, and Grausz JD. The TMC world wide gene therapy enrollment report. *Human Gene Therapy* 1996;10:775-800
- Melin AM, Perromat A, and Clerc M. In vivo effect of diosmin on carrageenan and CCl₄-induced lipid peroxidation in rat liver microsomes. *J Biochem Toxicol* 1996;11:27-32
- Moretto A and Lotti M. Exposure to toluene increase the urinary excretion of D-glucaric acid. *Br J Ind Med* 1990;47:58-61

- Mortensen SR, Chanda SM, Hooper MJ, and Padilla S. Maturation differences in chlorpyrifos-oxonase activity may contribute to age-related sensitivity to chlorpyrifos. *J Biochem Toxicol* 1996;11:279-287
- Nakachi K, Imai K, Hayashi S-I, Watanabe J, Kawajiri K. Genetic susceptibility to squamous cell carcinoma of the lung in relation to cigarette smoking dose. *Cancer Res* 1991;51:5177-5180
- Nakajima T, Wang R-S, Elovaara E, Park SS, Gelboin HV and Vainio H. A comparative study on the contribution of cytochrome P450 isozymes to metabolism of benzene, toluene and trichloroethylene in rat liver. *Biochem Pharmacol* 1992;43:251-257
- Nakajima T, Wang RS, Elovaara E, Gonzalez FJ, Gelboin HV, Raunio H, Pelkonen O, Vainio H and Aoyama T. Toluene metabolism by cDNA expressed human hepatic cytochrome P450. *Biochem Pharmacol* 1997; 53:271-277
- Nakajima T, Wang R-S, Katakura Y, Kishi R, Elovaara E, Park SS, Gelboin HV and Vainio H. Sex-, age- and pregnancy-induced changes in the metabolism of toluene and trichloroethylene in rat liver in relation to the regulation of cytochrome P450IIE1 and P450IIC11 content. *J Pharmacol Exp Ther* 1992;261:869-874
- National Research Council. Biological markers in reproductive toxicology. Committee on Biological Markers, National Academy Press, Washington, DC, 1989
- Nebert DW, Gonzalez FJ. P450 genes : structure, evolution, and regulation. *Ann Rev Biochem* 1987;45:945-993
- Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC and Nebert DW. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 1996;6:1-42
- NIOSH. NIOSH manual of analytical methods. Cincinnati 1984

- Norpoth KH, Muller G, Schell C, and Jorg E. Phenylguanine found in urine after benzene exposure. *Environ Health Perspect* 1996;104:1159-1163
- Ogata M, Tomokuni K, Takatsuka Y. Urinary excretion of hippuric acid and m- or p-methylhippuric acid in the urine of persons exposed to vapours of toluene and m- or p-xylene as a test of exposure. *Br J Ind Med* 1970;27:43
- Okada T, Kawashima K, Fukushi S, Minakuchi T, and Nishimura S. Association between a cytochrome P450CYP1A1 genotype and incidence of lung cancer. *Pharmacogenetics* 1994;4:333-340
- Parke DV, Williams RT. Studies in detoxication. The metabolism of benzene containing ^{14}C -benzene. *Biochem J* 1953;54:231-238
- Shields PG. Inherited factors and environmental exposures in cancer risk. *J Occup Med* 1993;35:34-41
- Sinjari T, Klasson-Wehler E, Hovander L and Darnerd PO. Hydroxylated polychlorinated biphenyls: distribution in the pregnant mouse. *Xenobiotica* 1998;28:31-40
- Sittert NJ, Boogaard PJ, Beulink GD. Application of the urinary S-phenyl-mercapturic acid as a biomarker for low level of exposure to benzene in industry. *Brit J Ind M* 1993;50:460-469
- Song B-J, Gelboin HV, Park SS, Tsokos GC, and Friedman FK. Monoclonal antibody-directed radioimmunoassay detects cytochrome P-450 in human placenta and lymphocytes. *Science* 1985;228:490-492
- Spatzenegger M, Jaeger W. Clinical importance of hepatic cytochrome P450 in drug metabolism. *Drug Metabolism Reviews* 1995;27:397-417
- Tardif R, Plaa GL, and Brodeur J. Influence of various mixtures of inhaled toluene and xylene on the biological monitoring of exposure to these solvents in rats. *Can J Physiol Pharmacol* 1992;70:385-393
- Umeno M, McBride OW, Yang CS, Gelboin HV, and Gonzalez FJ. Human ethanol-inducible P450IIE1: Complete gene sequence, promoter

- characterization, chromosome mapping and cDNA-directed expression. *Biochemistry* 1988;27:9006-9013
- Yamamoto T, Teramoto K and Horiguchi S. Effects of styrene on peripheral nerve conduction velocities in rat. *J Occup Health* 1997;39: 319-324
- Yu X, Johanson G, Ichihara G, Shibata E, Kamijima M, Ono Y, and Takeuchi Y. Physiologically based pharmacokinetics modeling of metabolic interactions between n-hexane and toluene in humans. *J Occup Health* 1998;40:293-301
- Shields FJ. Inherited factors and environmental exposure to hexane. *J Occup Med* 1993;35:41-42
- Sinjan T, Nilsson W, and Hultander L. Distribution of hexane in the human body. *Scand J Work Environ Health* 1983;9:1-6
- Stout NJ, Roggendorf PJ, Boush GJ. Application of the mouse model to human hexane toxicity. *Scand J Work Environ Health* 1983;9:1-6
- Song H, Gebel H, Park SS, Takahashi K, and Takahashi K. Monoclonal antibody directed against hexane-induced changes in P-450 in human placenta and lung. *Scand J Work Environ Health* 1983;9:1-6
- Spitznagel M, Jager W. Clinical importance of hexane metabolism. *Scand J Work Environ Health* 1983;9:1-6
- Tanaka H, Park SS, and Hultander L. Influence of various factors on the biological monitoring of hexane exposure. *Scand J Work Environ Health* 1983;9:1-6
- Lincoln M, Madsen G, and Hultander L. Hexane metabolism in humans. *Scand J Work Environ Health* 1983;9:1-6

유해인자별 생물학적 지표물질 개발에 관한 연구(Ⅱ)

-유전자다양성 분석을 통한 평가 방법-

[연구원 99-48-118]

발 행 일 : 1999. 5

발 행 인 : 원 장 정 호 근

연구수행자 : 책임연구원 김 기 응

발 행 처 : 한국산업안전공단
산업안전보건연구원

주 소 : 인천광역시 부평구 구산동 34-4

전 화 : (032) 5100-926

F A X : (032) 518-0862

비매품