

기초 과학 2부

환경성 화학물의 돌연변이 유발성 검정과 그 평가

한국원자력연구소, 분자생물학연구소 이 세 영

돌연변이는 유전자인 DNA에 화학적 또는 물리적 변화가 일어나는 것이고 이런 변화는 세포 혹은 개체의 자손에게 유전되는 것이다. 인간에는 거의 2,000에 가까운 돌연변이와 관련된 병이 알려져 있다. 돌연변이는 어떤 체세포나 생식세포에도 일어날 수 있으며 이로 말미암아 대부분의 세포는 죽게 되지만 때때로 유전적으로 그 기능이 변한 세포가 살아 남아서 유전적, 기형, 저능, '성장저하, 단명, 불임, 불명, 조르 등의 원인이 되고 특히 체세포의 돌연변이는 발암과 밀접한 관련이 있다. 생식세포, 돌연변이는 그것이 자손에게 전달되기 때문에 더욱 중대하다. 이렇게 유전자의 변화에 의하여 야기되는 인체에 대한 독성을 유전적 독성이라고 말할 수 있다.

독가스가 이차대전중 초파리에 돌연변이를 일으킨다는 사실이 발견된 이후 여러가지 많은 종류의 화학물질이 돌연변이 유발성을 갖고 있다는 사실이 알려졌다. 이들 돌연변이 유발성을 갖고 있는 화학물질은 방사선과 마찬가지로 혹은 그 이상의 강도로 암을 유발할 수 있으며, 유전병, 기형들을 유발할 수도 있다고 생각되고 있는데 이것은 지금까지 시험된 거의 모든 발암물질은 돌연변이 유발성을 갖고 있다는 사실이 현재 알려져 있고 또 모든 돌연변이 유발성 물질은 기형유발성을 갖고 있다고 생각하기 때문이다. 실제적으로 암유발물질의 생체실험이 많은 시간과 경비를 소모하므로 새로이 합성되는 수많은 화학물질에 대해 모두 이 실험을 한다는 것은 거의 불가능하며, 따라서 앞에 언급한 바

와 같은 실험적 근거로 돌연변이 유발능력의 검출 방법이 발암물질의 검출을 위한 예비실험으로 이용될 수 있을 것이다.

돌연변이 유발성물질은 자연계에도 존재하기 때문에 인간이 이들과 더불어 오랫동안 살아온 것은 사실이지만 지난 30년동안 급속한 과학기술의 발달로 화학물질의 용도가 갑자기 늘어남에 따라 이들에 의한 피해도 비례하여 갑자기 증가되고 있다. 우리가 일상생활에 사용하고 있는 것 화학물질들은 의약품, 화장품, 살충제, 식품첨가물, 세제, 기타 가정용품등 대단히 다양하다. 이들은 직접적으로 혹은 공기, 물, 토양을 통해 간접적으로 우리 체내에 흡수된다. 과학기술이 고도로 발달된 오늘날에도 암을 위시한 유전병등 돌연변이에 의해서 일어난 인간의 고통은 아직도 근본적으로는 고쳐지지 못하며 가까운 장래에도 그 해결이 어려울 것이라고 생각된다. 따라서 유일한 해결방법은 우리 환경에서 이런 유전적 활성물질들을 제거함으로써 미리 예방하는 방법밖에 없다. 그러므로 많은 과학자들이 우리 환경에 존재하는 이런 환경성 돌연변이 유발물질들을 발견해 내기 위하여 많은 노력을 하고 있고, 선진국에서는 대부분 신개발품에 대해서 그것의 사용허가를 허가전에 유전적 독성시험을 의무적으로 시행하도록 규정하고 있다. 피해가 발생하기 전에 유전독성 위험을 철저히 조사하는 것이 국가적으로나 산업계를 위하여 경비나 사회적 손실을 막는 최선의 길이기 때문이다.

유전적인 활성을 가지고 있는 화학물질은 그

구조에 있어서 대단히 다양하며 우리 생활에서의 이용면에서도 대단히 광범위하다. 화학물질의 유전적 활성도 홀몬등 다른 생물학적인 성질과 마찬가지로 조그만 구조의 차이로 크게 달라지기 때문에 그 성질을 직접 실험하지 않고는 정확히 예측할 수가 없다. 많은 알칼화성 화학물질은 일반적으로 돌연변이 유발성과 발암성을 가지고 있다는 것이 알려져 있기 때문에 어떤 물질의 알칼화 성질이 있다는 사실만으로 발암성과 돌연변이 유발에 대한 직접적인 실험적 증거가 없이도 그것이 유전적 독성의 위험이 있다고 간주되고 있다. 이 이외에도 일반적으로 유전자인 DNA에 intercalation하는 물질이나 DNA 유기염기의 유사체들도 돌연변이 유발성을 가지고 있다.

많은 환경성 발암물질이나 돌연변이 유발물질은 그것이 동물체내에 흡수되어 신진대사 과정에서 비로소 발암성 혹은 돌연변이 유발성을 갖게 되는데 이는 이 물질들이 동물체내에서 microsomal 효소 system 등에 의해서 활성화되기 때문이다. Aflatoxin, 방향족 아민화합물, 다핵성탄화수소등이 여기에 속한다. 발암성 다핵성탄화수소들은 동물체내에서 궁극적인 발암성형인 epoxides로 대사되며 이 epoxides는 아주 강력한 frameshift형의 돌연변이 유발성을 갖고 있다.

돌연변이는 gene (point) mutation과 chromosomal mutation(aerration)으로 나눌 수 있는데 이들의 검출을 위하여 여러가지 직접 혹은 간접적인 방법이 많이 고안되고 있다. 이들을 대별해 보면 다음과 같다.

- (1) Mutation in Microorganisms
- (2) Mutation in Eukaryotic Cells
- (3) Mutation in Mammalian Somatic Cells
- (4) Host-mediated Assays
- (5) Cytogenetic Analysis
- (6) Dominant Lethal Test
- (7) Specific Locus Test
- (8) DNA Repair Studies
- (9) Reaction with DNA

이중에서 현재 우리 연구실에서 이용되고 있

는 시스템은 (1), (3), (4), (5) 및 (8)이다.

사람의 유전적 독성을 평가하는 목적은 동물시스템을 검출방법으로 사용하는 것이 바람직하지만 박테리아를 사용하는 법은 예민하고 간단하며 염가로 신속히 수행할 수 있다는 잇점때문에 널리 이용되고 있다. 특히 이 방법은 Microsomal Enzyme Preparation을 쓰든지 Host-mediated Assay를 이용함으로써 동물체내에서 활성화되어야 하는 돌연변이 유발물질(Premutagen)도 검출할 수가 있다. Mutation 자체를 측정하는 것은 아니지만 DNA손상을 측정한다든지 손상된 DNA의 repair 혹은 repair가 결여된 세균에 선택적 독성을 측정하는 등 간접적인 방법이 때때로 mutation 자체를 측정하는 것보다 더 예민한 경우가 있어 이용하기도 한다

동물세포의 실험관 배양을 이용한 돌연변이 유발성 검출은 종래에는 많은 기술적인 문제가 있었으나 이제는 많이 개발되어 인체에 대한 독성 시험대신 표적 세포로서 사용되며, 박테리아 세포가 갖는 한계점은 보장하면서 이 박테리아 시스템의 많은 이점은 그대로 갖는 검출법이다. 이는 특히 동물의 체세포의 돌연변이를 검출할 수 있으므로 화학물질의 발암성과 돌연변이 유발성을 관련시키는데 이용가치가 많을 것으로 생각된다. 마우스의 암세포인 L5178Y는 유전적으로 인정하고 또 Host-mediated Assay를 할 수 있으므로 특히 이 목적으로 적합하다.

Chromosome aberration을 검출하는 cytogenetic analysis는 비교적 간단한 방법으로 화학물질의 염색체 손상유발능력을 검출할 수 있으며 염색체의 dicentrics, rings, chromatid exchanges, gaps, fragment 등을 관찰한다. Metaphase chromosome과 anaphase chromosome을 보는 방법이 각각 있으며 in vitro와 in vivo시스템이 있는데 in vitro시스템은 인위적 요소에 의한 오차가 많이 생기고 metabolic activation을 요하는 화합물질은 검출할 수 없기 때문에 in vivo 시스템이 권장되고 있다. Cytogenetic test의 하나인 micronuclei test는 방법이 간단하고 repair가 어려운 anaphase chromosome aberration을 검출할 수 있기 때

문에 특히 중요시되어 요사이 많이 이용되고 있다. 또 이 방법은 많은 세포들 짧은 시간내에 쉽게 관찰할 수 있기 때문에 많은 화학물질의 screening에 특히 편리한 방법이다. 그러나 화학물질의 돌연변이 유발성은 이들 여러 검출실험에서 숙주동물의 영양상태, 시험물질의 투여 경로, 실험온도등에 의하여 영향을 받을 수 있다.

일반적인 동물학에서는 인체의 독성을 평가하기 위하여 박테리아나 다른 미생물을 사용한다는 사실이 도저히 용납될 수 없는 것이지만 발암성이나 유전적인 독성의 평가에 있어서는 박테리아 DNA에 변화를 줄 수 있는 물질이라면 사람의 DNA에도 변화를 일으킬 수 있다고 생각되기 때문에 어느 정도 타당성을 인정할 수 있다. 물론 많은 화합물질들의 동물의 대사과정에서 activation되기도 하고 inactivation되기도 하기 때문에 중국에 가서는 동물 test시스템을 거쳐야 하지만 박테리아 test시스템이 많은 화학물질을 screen하는데 상당한 이용가치가 있다 비록 이런 screen에 의해서 우리 주위환경에 존재하는 발암물질, 유전독성물질을 검출하여 제거하기는 거의 불가능한 일이지만 위험물질들을 크게 줄일 수는 있을 것이다. 시험되지 않은 그 수많은 물질들을 평가하는데 있어서 가장 큰 문제는 시험하는 우선 순위를 정하는 것이다. 이 short-term 박테리아 시험을 통하여 발암성과 돌연변이 유발성을 가진 물질들이 일단 가려지면 고등동물 시스템에서 시험하게 하는 근거를 마련하게 된다. 그러나 이런 결과는 아직은 정성적으로 받아들여야 하며 인체에 extrapolation 할 수 있는 정량적인 data를 얻기 위해서는 다른 여러 시스템에서도 실험되어야 할 것이다.

현재 우리나라에서 시판되고 있는 농약, 의약품들의 돌연변이 유발성 여부를 실제 이들 방법을 사용하며 조사하였는데 그 결과의 일부를 여기에 소개해 본다.

(1) Salmonella-microsome system을 이용한 돌연변이 유발성 검정

여러 돌연변이 유발성 검출방법 중에서도 미

생물을 이용한 방법이 다른 어느 방법보다도 짧은 기간동안 많은 시료에 대해 동시에 시행할 수 있다고 평가되고 있으며 따라서 광범위한 환경오염성 물질에 대한 좋은 돌연변이 유발성 검출방법의 하나로 널리 추천되고 있다.

Ames등에 의해 개발된 이 방법은 최근 알려진 바처럼 “암유발 물질들의 돌연변이 유발 잠재능 내포”를 근거로 암유발물질의 일차적 검증에 널리 이용되고 있다. 초기에 Salmonella typhimurium LT-2의 histidine auxotroph균주만으로 돌연변이 유발원이 역돌연변이 유발능력을 보던 이 방법은 점차 돌연변이 유발원에 대한 감수성을 높이기 위해 repair deficient mutation 및 cells wall mutation 등의 부수적인 돌연변이를 균주에 도입시켰으며 역시 감수성을 높이기 위해 plasmid인 ampicillin resistant factor를 도입시킨 균주들을 사용하게 되었다.

한편 미생물에 대해서 직접적인 돌연변이 유발원이 못되는 화합물들도 포유동물의 간 microsomal enzyme들을 처리하면 돌연변이 유발성 물질로 변화될 수 있다는 사실로부터 in vitro에서 간접적으로나마 포유동물 생체내에서의 대사와 유사한 과정을 재현하여 in vivo실험을 직접하지 않고도 어떤 비활성 물질이 생체내에 흡수된 뒤 활성화되어 돌연변이를 일으킬 수 있는가에 대한 가능성을 추적할 수 있게 되었다. 최근 Salmonella typhimurium의 histidine auxotroph를 사용하는 실험에서는 대부분이 병용하여 사용하고 있다.

본 발표는 S. typhimurium의 base substitute mutant인 TA1535와 frameshit mutant인 TA1538의 두 균주와 또 이에 각각 R. factor인 pKM 101을 도입시킨 TA100 및 TA98의 도합 네 균주를 사용하여 국내에서 사용하고 있는 화장품(머리 염색약), 농약(살충, 살균 및 제초제), 의약품(구충제, 해열진통제, 항원중제) 등에 대한 돌연변이 유발성을 검토한 결과를 종합한 것이다. 표 1은 수집되어 조사된 화합물질을 나타낸다.

여러 농도의 시료를 균과 같이 한천배지상에

Table 1. Chemicals tested in the Salmonella/microsoms system

Cosmetics (2)
 p-Phenylenediamine, Nitro-p-phenylenedia-
 mine.
 Pesticides (19)
 (Insecticides (12))
 DDVP(dichlorvos), Naled(Dibrom), Sumith-
 ion(Fenitrothione), Malathion, Trichlorfon
 (Dipterex), BHC(Lindane), Diazinon, ETN,
 DDT, Baygon(Propoxur), Omite, BC-100:
 (Herbicides (2))
 MO, NIP (TOK)
 (Fungicides (5))
 TMTD, Polyoxin-D, Vitavax, Blastidine-
 S, Kasugamycin.
 Vermicides (7)
 Pyrantel pamoate, Pyrvinium pamoate,
 Bephenium hydroxynaphthoase, Piperazine,

Mebendazole, L-Tetramizole, Bithionol.
 Pyriner (5)
 Antipyrine, Aminopyrine, Sulpyrine, Isop-
 ropylantipyrine, Phenylbutazone.
 Trichomonacides (7)
 Witrofurantoin, Nifuratel, Furazoleidone
 Metronidazole Aminitrozole, Nimorazole,
 Ornidazole.

접종하고 균체수가 시료의 독성에 의해 감소되
 지 않은 최고농도를 정한 뒤 그 농도에서의 돌
 연변이 유발성이 시험되었다. 돌연변이 유발성
 을 나타낸 화합물들은 모두 17가지로서 그 화학
 구조식은 그림 1이, 각 균주에 대한 돌연변이
 유발성은 표 2가 각각 보여준다.

아시아 및 남미에서 머리 염색약으로 쓰이고
 있는 p-phenylenediamine(PA)과 유럽 및 북미
 에서 쓰이고 있는 nitro-p-phenylenediaminc
 (UPA)의 두 방향족 아민화합물을 돌연변이 유

Table 2. Mutagenicity of chemicals on TA1533, TA1538, TA100 and TA98 with or without microsomal enzyme activation

Strain s-9 Compound	TA 1535		TA 100		TA 1538		TA 98	
	+	-	+	-	+	-	+	-
P-Phenylenediamine	-	-	-	-	### ^a	-	###	-
Nitro-p-phenylenediamine	-	-	-	-	### ^b	###	###	###
TMTD	+	+ ^d	###	## ^c	-	-	-	-
NIP	-	-	##	-	-	-	± ^e	±
MO	-	-	-	-	-	-	+	+
Trichlorfon	-	-	+	+	-	-	-	-
DDVP	+	+	###	###	-	-	-	-
Sumithion	-	-	##	-	-	-	-	-
Naled	±	±	±	±	-	-	-	-
Pyrvinium pamoate	-	-	##	##	-	-	-	-
Nitrofurantoin	-	-	###	###	-	-	-	-
Nifuratel	-	-	###	###	-	-	##	##
Furazolidone	-	-	###	###	-	-	+	+
Metronidazole	##	##	###	###	-	-	+	+
Aminitrozole	-	-	###	###	-	-	-	-
Nimorazole	+	+	###	###	-	-	-	-
Ornidazole	###	##	###	###	-	-	##	##

a. ###, very strongly mutagenic (over 500 revertants per plate after spontaneous revertants were subtracted)

b. ##, strongly mutagenic (500-300).

c. #, moderately mutagenic (300-100).

d. +, weakly mutagenic (100-0).

e. ±, ambiguous.

발성에 대해 직접 및 microsomal activation system으로 조사한 바 UPA는 직접 처리했을 때 강한 돌연변이 유발효과를 나타내고 microsomal 효소에 의한 활성화로는 그 비율이 증가되지 않은 반면 우리나라에서 널리 사용되고 있는 머리염색약의 주성분인 PA는 microsomal 효소를 이용한 실험과정에서 활성화되면 돌연변이를 강하게 유발시킨다는 것이 확인되었다.

Ames 등은 미국에서 시판되는 산화형 머리염색약 제품들의 조사에서 89% (150/169) S. typhimurium system에서 돌연변이 유발성을 나타낸다고 보고하고 있고 일본의 경우 Sugimura가 S. typhimurium, E. coli 또는 B. subtilis system으로 조사하여 82% (146/179)가 돌연변이 유발성을 나타낸다고 발표하고 있다. 우리는 머리염색약의 주성분인 PA와 NPA를 조사하여 모두 강력한 frameshift mutation을 유발시킨다는 것을 확인하였다.

농약은 식생산량의 견지에서 인류생활과 가장 긴밀한 관계에 놓여 있을 뿐만 아니라 전 세계적으로 그 사용량이 엄청나기 때문에 이들이 갖는 고등동물에 대한 일반적 독성조치도 크게 문제시되고 있는 환경 오염성 물질중의 하나이다. 더구나 이들이 유전적 독성인 돌연변이 유발성을 혹은 발암성을 갖는다면 이들의 사용에 훨씬 큰 주의를 요하게 되는 것이다.

실험에 사용된 농약은 19종으로 이중에서 Fungicide에 쓰이는 TMTD와 살충제 sumithion 및 제초제 NIP는 microsomal enzyme activation에 의해 base substitute type의 돌연변이 유발성을 나타냈고, 살충제 DDVP 및 trichlofon은 직접적으로 TA 100에 대해 돌연변이 유발성이 있었으며, 제초제 MO는 직접적으로 frameshift type의 돌연변이를 각각 나타냈다. Naled는 독성이 매우 강한 반면 대조구에 비해 revertant의 증가비가 현저하지는 않아 돌연변이 유발물질로 확실하게 단정할 수는 없었지만 미약하나마 dose에 대한 response를 나타내고 있다.

최근 Shirazu 등 (1976, Mutation Res., 40: 19)은 166종의 농약에 대해 B. subtilis를 사용

한 rec-assay와 E.coli 및 S. typhimurium의 reversion assay를 병행 사용하여 광범위한 돌연변이 유발성 검출결과를 보고하고 있다. 본 실험에 사용된 농약중에는 상기의 Shirazu 등의 논문에도 포함된 것도 여러개 있으나 이들이 사용한 균주보다 훨씬 돌연변이 유발원에 대한 감수성이 높은 R. factor plasmid를 가진 TA 100과 TA 98을 사용하였고 이들을 다시 microsomal activation system으로 처리하여 실험하였기 때문에 Shirazu 등이 사용한 system에서 돌연변이 유발성이 음성으로 나타난 여러 화합물이 약한 양성 또는 비교적 강한 양성으로 나타나고 있다.

한편 수집하여 조사한 의약품들은 국내에서 시판되는 각종 구충제, pyrine 계열의 해열진통제 및 nitrofurane과 nitroimidazole 계열의 항원중, 항진균제들이었다.

실험에서 돌연변이 유발성이 나타난 화학물질은 구충제중 pyrvinium pamoate와 항원중제제 7종의 도합 8종이었다. 이들중 nitrofurane 유도체인 furazolidone과 nitrofurantion, nitroimidazole 유도체인 metronidazole 및 nimorazole에 대한 미생물의 돌연변이 유발성은 이미 보고된 바 있으나 구충제 pyrvinium pamoate와 나머지 trichomonacide 3종인 nitrofurane 유도체인 nifuratel, nitrothiazole 유도체인 aminitrozole 및 nitromidazole 유도체인 ornidazole에 대한 돌연변이 유발성은 아직 보고된 바 없었던 약품들이다.

지금까지 가장 널리 사용되어 오던 metronidazole제제는 외국에서의 잇다른 돌연변이 유발성 보고로 사용이 바로 규제되리라 믿어지고 있으며, 최근 국내에서 널리 시판되는 ornidazole의 경우는 미생물 system에 대한 실험에서는 metronidazole보다 오히려 강한 돌연변이 유발성을 보여주고 있다. 특히 이 ornidazole은 s-9 microsomal enzyme activation에 의해 돌연변이 유발성이 약간 증가되는 현상을 보여준다.

(2) 포유동물 시스템을 이용한 돌연변이 유발성 검정

미생물을 이용한 시스템들이 돌연변이 유발물

질에 의한 유전자 손상의 분자적 본질 등 많은 근본적인 유전문제를 연구하는데 대단히 유용한 것은 사실이지만, 인간과 같은 고등생물은 박테리아같은 미생물에서 볼 수 없는 대단히 복잡한 대사기구를 갖고 있다는 사실도 간과할 수 없기 때문에 인체에 해가 있는 돌연변이 유발물질을 확인하기 위해서는 동물세포를 표적으로 사용하는 동물 시스템이 필요한 것이다. 이는 박테리아의 유전물질과 동물의 유전물질이 그 화학적인 활성이나 유전정보 표현기구에 있어 틀릴뿐 아니라 돌연변이 과정에 영향을 줄 수 있는 대사과정의 차이, 유전자의 손상을 복구하는 과정에 있어서 차이가 있다고 생각되기 때문이다.

전향의 *S. typhimurium*을 이용한 검사법에 서 돌연변이 유발성을 나타낸 농약과 의약품을 대상으로 포유동물 세포에서의 유전적 손상 및 그 영향을 (1) Micronucleus 검사법, (2) DNA repair 유발검사법, (3) 체외 배양중인 L5178Y 세포의 돌연변이 검출법 등을 사용하여 조사했다 표 3은 포유동물 세포에서 얻어진 결과를 종합한 것이다.

(가) Micronucleus 검사법

생쥐의 골수세포에서의 micronucleus test(MNT)는 화학물질에 의해 생체내(in vivo) 상태에서 유발된 염색체의 구조나 수적 변화를 찾아내는 선발법으로서 현재 공인을 받고 있다. 이 방법은 최종적인 염색체 복제와 세포분열을 하고 있는 적혈구 아세포(erythroblast)를 조사대상으로 하여 그 효과 및 영향을 신생된 적혈구 세포(polychromatic erythrocyte, PCE)에서 관찰하므로서 조사물질의 영향으로 생긴 결과를 직접 볼 수 있는 잇점을 지니고 있다. 이 방법은 또한 표본의 제작과 관찰이 간단하고 빠른 장점이 있고 대조구에 있어서 micronuclei의 빈도가 매우 낮으므로 감도가 그만큼 높아지며 핵형에 무관하므로 포유동물의 다른 종간에서의 비교도 가능하며 또한 염색체의 불분리 현상같은 방추사 손상에 의한 효과까지도 포함되므로 점정분석법에 매우 좋은 방법이 된다.

보통 한마리당 약 2,000개 정도의 PCE를 관찰

하면서 이때 micronucleus를 지닌 것을 조사했다 별도로 micronucleus를 지닌 normocyte도 있으면 동시에 관찰한다. 이렇게 함으로서 artifacts의 존재여부를, 또한 조사물질의 작용양상에 대한 정보를 얻을 수 있다. Erythroblas의 최종 S. phase로 부터 세포분열(mitosis)을 거치고, 그후 핵이 없어지면서 완전 분화된 적혈구(red normocyte)로 성숙될때까지 약 30시간이 좀 넘게 걸린다. 그러므로 본 실험방식에 따르면 아직 완전 성숙되지 않은 적혈구인 PCE에서 보인 micronucleus는 s-phase에 일어난 손상을 나타낸다고 볼 수 있다.

Table 3. Mutagenicity of chemicals in mammalian systems

	Micronucleus test	DNA Repair	L5178Y mutagenicity
Pesticides			
DDVP	-	+	-
Trichlorfon	-	+	-
TMTD	+	+	+
MO	-	-	
NIP	-	-	
Vermicide			
Pyruvium pamoate	-		-
Trichomonacides			
Metronidazole	+	-	
Nimorazole	+		
Ornidazole	-		
Furazolidone	-		
Nifuratel	-		
Nitrofurantoin	-		

+, positive; -, negative

한편 세포가 처음 손상을 받았을 때 S-phase의 마지막에 있었거나 또는 그 손상이 G₂시기나 mitosis에서 이루어졌다면, 이때 생긴 micronucleus를 지닌 세포들은 normocyte시기로 되어 질 것이다. 또한 특히 후자에서는 방추손상(spindle poison)의 경우가 포함된다. 그러므로 일반적으로 1,000개의 PEC를 관찰하는 사이에 1개 이상의 micronucleated normocyte가 보이면 이는 S-phase 이후의 세포시기에서 나타난 영향 및 효과라고 볼 수 있다.

환경성 화학물의 돌연변이

조사된 5종의 농약중에서 유기유황계 TMTD에서 micronuclei의 출현빈도가 대조군에 비해 통계적으로 유의한 결과를 나타냈고, 의약품중에서는 항원중제로 쓰이는 nitroimidazole 유도체인 metronidazole, nimorazole이 통계적인 유의성을 보여 주었다. 이들 양성결과를 보인 화학물질들에서 얻은 데이터를 표 4에서 볼 수 있다. 일반적으로 이들 농약이나 의약품들의 포유동물세포에서의 돌연변이 유발에 대한 실험 보고는 아직까지는 거의 없는 형편이다. 표 4에서

이들이 선량증가에 따른 효과의 증가를 나타낼 수 있다.

많은 종류의 nitro-heterocyclics인 물질들이 돌연변이 유발성을 갖는다는 보고들이 있고, metronidazole에 대한 박테리아의 직접실험법에서 돌연변이 유발성을 나타낸 보고들과 이를 섭취한 사람의 오줌에서 추출한 대사 산물들에 있어서도 돌연변이 유발성을 보고한 경우들을 볼 수 있다. 또한 metronidazole이 생쥐에 폐종양과 lymphoma를 일으킨다는 보고가 있다.

Table 4. Results of the micronucleus test in mice (2 dose separated by 24 hr)

Chemicals	Route ^b	Solvent ^c	Single Number dose of (mg/kg) mice	Number of micronucleated cells analysed	Micronuclei % (mean ±SE)
TMTD	IP	DMSO	12.5 3	23/5100	4.51±0.11
			25.0 3	44/8400	5.24±0.62
			50.0 3	49/6000	8.17±1.06 ^a
			100.0 4	102/8300	12.29±0.09 ^a
Metronidazole	PO	H ₂ O	50.0 3	50/6300	7.94±0.79 ^a
			100.0 3	42/4900	8.57±0.35 ^a
		CMC	200 2	26/3500	7.43±0.36 ^a
			400 3	30/6300	7.06±1.87 ^a
		"	1600 3		4.76±0.27
			400 3	45/8600	5.23±0.49
Nimorazole	PO	CMC	800 3	88/9000	9.78±1.09 ^a
			1600 ^d 3	85/6300	13.49±1.96 ^a
			Control (pooled)		

a. P. significantly higher than 0.05.

Tables of Kastenbaum Bowman (1970, Mutation Res., 9, 527) used for determining statistical significance.

b. IP: intraperitoneal, PO: per os.

c. DMSO: dimethylsulfoxide (final conc. was less than 5%).

CMC: carboxymethyl cellulose (0.5%).

d. Single injection because of high toxicity.

그러나 이 metronidazole을 쥐나 사람들이 섭취한 후 배설한 오줌에서 박테리아에 돌연변이를 일으킨 수 있는 대사 산물들이 발견된다는 보고 이외에는 직접 포유동물에 돌연변이 유발성을 나타낸다는 보고는 아직 볼 수 없다.

(◇) DNA Repair 유발 검사법

화학물질들이 DNA와 작용하여 나타낸 상해 등은 세포가 지니고 있는 회복과정(repair pro-

cess)에 의해 수선된다. 이때 회복과정에서 잘못이 이루어지면 돌연변이와 같은 영구적인 변화로 세포내에 남게 된다. 포유동물세포의 DNA 회복과정의 본질에 대해서는 아직껏 완전히 설명이 될 수 없지만 아마도 박테리아의 excision repair와 유사한 경로를 밟지 않나 생각되고 있다. 한편 유전적 활성을 지닌 많은 물질들이 DNA repair system을 유발한다고 알려져 있기 때문에 이 DNA repair 분석법은 잠재적 유

전적 활성을 지닌 화학물질들의 검출에 이용될 수가 있다.

세포주기의 DNA 합성기인 S-phase가 아닌 시기의 세포에서 이루어지는 DNA 회복합성을 UDS(unscheduled DNA synthesis)라 하는데 이는 DNA상의 손상을 회복하는 repair process를 말하며, 이는 ³H-TDR과 같은 DNA합성에 필요한 전구물질을 받아 들인 것을 liquid scintillation counting법이나 autoradiography법으로 쉽게 측정할 수 있다.

본 실험에서는 사람의 혈액서 순수 분리한 림파구세포를 이용하여 liquid scintillation counting법으로 5종의 농약과 metronidazole에서 UDS를 측정하였다.

유기인계 살충제인 DDVP와 Trichlorfon 및 유기염소계 살균제인 TMTD가 UDS를 유발한

다는 사실을 얻을 수 있었다(표 5).

(◇) L5178Y Cell Mutagenesis System

포유동물 세포 시스템을 이용한 돌연변이 유발물질의 검출에 사용할 수 있는 세포는 우선 핵형이 안정되어 있어야 하고 cloning efficiency가 좋아야 하는데 쥐의 임파종양인 L5178Y세포는 이런 조건에 매우 적합한 재료이다. 이 세포는 10% 말혈청을 포함한 Fischer's Medium (EMS)으로 시험관 배양이 가능하고 또한 DBA/2나 BDF₁과 같은 생쥐의 복강내에서도 계대배양이 되므로 특히 활성이 요구되는 돌연변이 유발물질의 검출에 좋은 재료가 된다. Methotrexate(MTX)를 genetic marker로 하는 약물 저항성 돌연변이(팀 rug-resistant mutation)로써 돌연변이 유발성을 검사했다.

조사물질은 cloning toxicity test를 하여 돌연변이 유발성 검사를 위한 농도를 결정한 다음(보통 80%의 세포가 죽은 농도)이 농도로 1.2×10^7 세포에 적당시간 처리한 후조사물질을 씻어내고 세포를 1×10^5 cells/ml가 되도록 희석한 다음 세포수가 5×10^5 cells/ml를 넘지 않도록 유의하여, 희석하면서 96시간동안 37°C 항온기에서 배양한다. 그후 soft agar cloning으로 MTX에 저항성을 띤 colony의 수를 측정함으로써 돌연변이 출현율을 결정한다.

Micronucleus 검사법이나 DNA repair 유발검사에서 양성결과를 보인 DDVP, trichlorfon, TMTD와 metronidazole 그리고 구충제인 pyrinium pamoate에 대해서 조사했다(표 6). 살균제인 TMTD에서 양성결과를 얻었다. Metronidazole의 경우는 실험중 얻어진 일부 결과로서 약간의 상대 돌연변이율의 증가를 볼 수 있지만 통계적 처리를 할 수 있도록 현재 실험이 더 진행중에 있다.

TMTD의 경우 돌연변이 상대 출현빈도가 2배 이상이 되었다는 사실은 이 조사시스템이 포유동물 세포에 대해서 행해졌다는 사실과 더불어 매우 중대한 의의를 지닌다. 이때 사용한 TMTD 농도는 L5178Y 세포에 매우 높은 독성을 나타내는 농도이기는 하지만, 농도증가에 따른 돌연변이

Table 5. Uptake of ³H-thymidine by human lymphocytes after treatment with chemicals in vitro

	Doses	Cpm	#fold increase over control
DDVP	0	167	
	10 ⁻⁴	234	1.40
	10 ⁻³	349	2.09
	10 ⁻²	350	2.10
	10 ⁻¹	534	3.20
	+a	360	2.16
Trichlorfon	0	186	
	10 ⁻⁶	275	1.48
	10 ⁻⁷	443	2.38
	10 ⁻⁴	340	1.83
	10 ⁻³	258	1.39
	+	510	2.74
TMTD	0	57	
	10 ⁻⁷	50	0.88
	10 ⁻⁶	92	1.61
	10 ⁻⁵	103	1.81
	+	137	2.40

2×10^6 cells/ml human lymphocytes were treated with chemicals for 1 hr. The cells were labeled with ³H-thymidine (0.1uCi/ml) in the presence of 10 mM hydroxyurea for 3 hrs. The acid-insoluble counts were measured. a; nitromin(1×10^{-4} M) was treated each time as a positive control.

환경성 화학물의 돌연변이

기율의 증가도 볼 수 있었다. TMTD에 대해서 행한 micronucleus test의 결과도 양성으로 나타나 있는 점으로 보아 이 물질의 포유동물세포에

대한 유전독성을 새로이 평가해야만 될 것이다. 조사된 의약품들중 현재 항원중계 또는 항진균제로 널리 쓰이는 5-nitroimidazole 유도체들

Table 6. Induction of MTX-resistant mutation in L5178Y cells in vitro

Chemicals	Hours treated	Treatments	# of resistant colonies recovered	# total cells/plate (x10 ⁶)	MF _t /MF _b
DDVP	4	0	60	12.8	
		10ug/ml	44	7.2	1.3
		20ug/ml	29	4.8	1.3
Trichlorfon	4	0	22	2.8	
		22×10 ⁻⁷ M	20	3.2	0.8
		4×10 ⁻⁴ M	40	3.6	1.4
		8×10 ⁻⁷ M	17	1.6	1.4
TMTD	18	0	8	3.2	
		2.5×10 ⁻⁷ M	11	3.2	1.4
		5.0×10 ⁻⁷ M	37	4.0	3.7 ^c
Pyrvipium Pamoate	4	0	6	4.8	
		1×10 ⁻⁷ M	5	5.2	0.8
Metronidazole ^d	4	0	5	1.6	
		2×10 ⁻² M	8	1.6	1.6
		4×10 ⁻² M	10	1.6	2.0

- a. The number of mutants were normalized by multiplying the factor required to bring the cloning efficiency of the controls to the controls to 100%.
 b. Ratio of the mutant frequency of treated cells to that of control cells.
 c. P. significantly higher than 0.05. d. Now in progress.

은 박테리아 시스템에서 강력한 돌연변이를 일으킨다는 사실과 더불어 또 metronidazole은 생쥐에 암을 일으킬 수 있다는 사실과 본 논문에서 밝혔듯이 생쥐의 골수세포에서 염색체 이상을 일으켰다는 사실로부터 포유동물인 인간에서도 염색체 이상이나 기타 유전적 손상을 끼칠 가능성이 높기 때문에 또한 그 사용이 특히가 임년령층에서 많기 때문에 일단은 그 사용에 어떤 제재가 가해져야만 할 것이라고 본다. 한편 이들 물질의 화학치료 요법적 효과는 그대로 지니면서 돌연변이 유발성과 같은 유전적 작용을 나타내지 않는 유도체를 새로이 합성하거나 찾아내어 대신 사용되는 방법도 고려되어야만 될 것이다. 어떤 화학물질들이 독성과 유익성을 동시에 갖고 있을 때는 그 비중을 고려하여 사용여부를 결정하는 것이 상식으로 되어 있다. 그것은 그 독성이 발암성 같은 유전독성의 경우에도 마찬가지로 그 원리가 적용이 되어야 한다. 현실적으로 우리 사회에서 완전히 이런 독성물질을 제

거할 수는 없지만 우리가 실제로 얼마나 위험을 무릅쓸 수 있으며 또 그럴 가치가 있는냐를 결정하여야 한다. 유익성측으로서 그 사회의 특별한 경제적, 사회적 혹은 의학적인 사정을 고려한 correction factor가 가산되어야 한다. 우리는 결코 어떤 물질이 절대적으로 안전하다고 과학적으로 증명할 수는 없지만 실험실 test, 임상실험, 역학적 실험등의 종합적 연구를 통하여 그 물질이 끼칠 수 있는 위험성의 한계를 어느정도 확인할 수는 있다. 처음 screen test에 의해서 그 독성이 검출되었을지라도 위험성—유익성 평가를 위한 정량적인 data를 얻기 위하여 광범위한 고등동물 시험이 뒤따라야 한다. 위험성—유익성의 평가는 결국은 정부의 책임하에 정책적으로 해야 하는 것이며, 명확하게 정량적으로 계산한 결과를 갖고 평가되어야 한다. 특히 이점을 강조하는 이유는 선진국에서도 종종 과학적이 아닌 요소가 정책에 반영된 예가 있기 때문이다.