

## 2-Bromopropane의 經胎盤 影響에 관한 研究

-마우스 胎仔로의 移行과 태자세포의 복제 DNA 합성세포에 관하여-

金永煥 · 裴恩相

고려대학교 병설 보건대학 환경위생과

## Cytogenic Effects of Transplacentally Administered 2-Bromopropane

-Pattern of Replicative DNA Synthesis(RDS) by BrdU Labeling Method-

Young-Whan Kim · Eun-Sang Bae

Dept. of Environmental Sanitation, Junior College of Health Sciences, Korea University

### Abstract

2-Bromopropane has been implicated to be the reason for the mass intoxication of workers at an electronic company in Korea.

2-Bromopropane deposition and pattern of DNA replication in mouse fetuses were analyzed after intravenous injection of 2-bromopropane. Injections were administered to pregnant ICR mice in order to cytogenetically evaluate transplacental 2-bromopropane.

The results are summarized as follows;

1. A dose-dependent effect on DNA replication was observed equally in the lung, liver and kidneys of fetuses has been exposed to 2-bromopropane transplacentally as reductions of the labeling index.
2. Deposition of transplacentally administered 2-bromopropane in the fetus was lower than placenta.

**key words:** 2-bromopropane, labeling index.

### I. 서론

금세기 모든 과학분야 특히 화학과 공학의 발전에 수반하여 지구상에 계속적으로 합성되어 사용되고 있는 화학물질의 연간 총 생산량은 4억톤이 넘고 있으며 세계적으로 등록된 화학물질의 수만도 과거 20년간 800만종을 초과하여 매주 8,000

내지 10,000종에 달하고 있음이 보고되고 있다.<sup>1)</sup>

우리 나라의 경우에도 국내에서 취급되어지고 있는 화학물질의 종수는 약 36,000종에 이르고 있어 이들에 대한 안정성 확보를 위한 노력이 국가적으로 요구되고 있다.<sup>2)</sup>

따라서 이미 정부는 새로운 화학물질의 제조와 수입이 늘고 있는 추세와 관련하여 유해성이 확인

이 논문은 1997년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.

된 기존화학물질에 대하여서는 근로자의 건강장해를 예방하기 위하여 필요한 조치를 취하도록 하고 있으며, 새로이 생성된 미지의 화학물질에 대하여서는 효과적인 예방조치를 취할 수 없는 상황에 대하여서는 미비한 상황을 보완, 개선하기 위하여 1990년 신규화학물질의 유해성조사제도를 도입하여 새롭게 사용되어지는 화학물질로부터 근로자의 건강장해를 예방하고자하는 노력을 경주하고 있다.<sup>3)</sup>

한편, 1996년부터 물질안전보건자료(MSDS)제도의 시행으로서 물질정보의 작성, 비치 및 교육의무를 부가하여 모든 화학물질로 인한 질병발생의 예방능력을 높여려는 노력을 배가 하고 있다.<sup>4)</sup>

이상과 같이 산업안전보건법에 기초한 많은 연구와 행정능력을 동원하여 직업병 예방에 대처하고 있음에도 불구하고 산업재해 및 직업병 발생률은 둔화되지 않고 있는 것이 우리의 현실이다.<sup>5)</sup>

이와 같은 원인은 건강에 영향을 줄 수 있는 수 많은 유해화학물질로부터의 효과적인 예방을 위하여서는 사업장내의 유해요인의 인지, 그에 대한 평가 및 대책 수립 등이 삼위일체가 되어야 할 것이나 그러한 수준에 미치지 못하고 있음에 기인한다.

1995년 8월 전자부품 제조회사 TACT S/W 제조공정에서 2-bromopropane이 주원료인 솔벤트 5200을 침지액으로 사용한 여성근로자 11명에게서 월경이 중단되고 2명은 재생불량성 빈혈로 입원하는 집단적인 직업병이 발생한 바와 같이 유해성이 충분히 확인되지 않은 화학물질의 취급에 따른 심각성이 부각된 바 있다.<sup>6)</sup>

문제가 된 2-bromopropane은 미국 산업안전보건연구원(NIOSH)를 포함한 선진외국에서 제공한 독성정보를 분석한 결과 동물실험에서 경미한 중독증상을 보인다는 독성자료 외에는 충분한 독성자료가 없다는 것으로 판명되었으나 국내에서는 역학조사를 통하여 2-bromopropane에 의한 근로자 생식기능과 골수장해의 직업병을 인정한 바 있다.<sup>6,7)</sup>

본 조사에서는 세포독성을 확인하기 위한 하나의 평가방법으로서 BrdU를 이용한 labeling Index법을 적용하여 2-bromopropane을 투여한 임신 마우스태자의 간장, 폐장, 신장세포에 대한 복제

DNA 합성세포 표식율을 조사함으로써 투여농도에 따른 경태반 세포독성을 조사하였고 또한 2-bromopropane의 태반을 통한 태자로의 이행정도를 조사하여 그 결과를 보고하고자 한다.

## II. 조사대상 및 방법

### 1. 조사대상물질

조사대상물질은 CAS No. 75-26-3인 2-bromopropane 일명 iso-propyl bromide(일본 순정화학주식회사 제품)를 실험 대상으로 하였다.

### 2. 실험동물

실험동물은 ICR 마우스 10주령을 교배하여 교배 다음날을 임신 0일로 하고 임신 16일째의 마우스를 실험동물로 하였으며 실험군과 대조군으로 구분하였다.

### 3. 피검물질의 투여방법

꼬리정맥을통하여 주사하였다.

### 4. 투여량

LD<sub>50</sub>량을 최고 용량으로 하였고 LD<sub>50</sub>의 1/2, 1/4, 1/8, 1/16의 량으로 투여량을 설정하여 단계적으로 투여 하였다.

### 5. 태자 세포에서의 BrdU에 의한 DNA labeling index조사<sup>8)</sup>

#### 5.1 표본의 작성

피검물질 투여 완료 23시간 후에 BrdU 100mg/kg을 각각 복강내 투여하고 1시간후에 mouse 한 배당 좌우 자궁각에서 각 1마리씩 2마리의 태자를 적출하여 formalin고정한다. Silde를 미리 Poly-L-lysine 10,000배 희석액으로 coating하여 조직과 편이 떨어지지 않도록 처리한 다음 태자의 paraffin section을 고착시킨다.

#### 5.2 ABC(avidin-biotin peroxidase complex)법에 의한 BrdU의 면역조직화학적 염색

① paraffin 파편을 xylene으로 탈 paraffin시킨

다음 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, methanol 용액으로 세포내에 들어있는 peroxidase의 활성을 제거하고 2차 증류수로 세척한다.

- ② 4N-HCl로 37°C에서 20분간 처리하여 DNA를 단순화시킨 다음 붕산 완충액으로 중화시키고 0.02% actinase 2-3적을 가하여 20분간 moisture chamber에서 정치하여 단백분해 효소를 처리한다.
- ③ horse serum으로 (actinase와 같은 방법으로) 10분간 incubation시킨 다음 PBS로 세척하고 mouse monoclonal 항 BrdU항체를 2-3적 가하고 상온에서 30분간 Incubation시킨다.
- ④ PBS-triton x-100으로 silde를 세척한 다음 biotin화 2차항체를 actinase와 같은 방법으로 가하고 상온에서 30분간 incubation하여 항 BrdU항체와 항원 항체반응을 시킨다.
- ⑤ ABC용액과 30분간 반응시켜 ABC와 2차항체와 화학결합 즉 ABC complex를 형성시킨다.
- ⑥ DAB용액 중에 표본을 3초간 넣은 다음 PBS로 세척하고 hematoxylin으로 1분간 염색한다.

### 5.3 BrdU 표식세포의 관찰

BrdU의 면역조직화학적 염색에 의해 갈색으로 발색된 BrdU 표식세포를 정상세포 1,000개에 대한 비로 나타낸다.

## 6. 태반과 태자내의 2-bromopropane의 측정<sup>9)</sup>

가스크로마토그래피(GC)와 GC/MS에 의해 태자에서의 2-bromopropane을 측정한다.

- ① 측정방법 - Head Space법
- ② 검출기 - ECD(Electron Captured Detector)
- ③ 칼럼 - HP-1, HP-17

## III. 조사성적

본 실험의 조사성적은 Table 1.과 같다. 태반과 태자의 2-bromopropane의 농도 측정 결과를 보면 다량의 검체를 투여한 경우가 소량의 검체를 투여

한 마우스의 태반에 비하여 비교적 낮은 양이 검출되었다. 태자의 2-bromopropane의 농도측정 결과를 보면 최저평균 0.93 µg/g으로부터 최고 평균 2.09 µg/g의 농도를 보였다.

태자의 2-bromopropane의 농도에 비하여 태반의 농도가 2-bromopropane의 최저 1.7배에서 최고 6.8배 높았다. 한편 saline을 투여한 마우스태자의 폐장과 간장 그리고 신장 세포의 labeling index는 각각 20.14%, 28.74%, 35.90%였으며 2-bromopropane의 투여량과 관계없이 모두 labeling index가 saline 투여군에 비하여 2배를 초과하지 않음으로서 2-bromopropane이 태자세포 DNA복제에 영향을 주지 않는 것으로 나타났다.

## IV. 고 찰

MSDS에 나타난 2-bromopropane의 독성 자료는 매우 부족하며 1996년 노동부와 환경부에서 정한 기존화학물질 목록에는 03708번에 등재되어있다.<sup>2)</sup>

2-Bromopropane은 1995년까지만 하여도 독성에 관한 충분한 자료가 확보되지 않았으며 최근 일부 산업장에서 2-bromopropane을 사용하는 근로자에서 난소기능저하증과 정자기능 생산저하증을 보임으로서 그 독성에 대한 관심이 고조되기 시작하였다.

따라서 2-bromopropane에 대한 각종 독성의 평가가 시도되었고 유일재 등<sup>10)</sup>에 의하여 미생물을 이용한 돌연변이 유발시험 결과 *S. typhimurium* TA 100과 TA 1535균주에서 염기치환형의 돌연변이를 유발하는 것을 확인한바 있으나 포유류 배양세포를 이용한 염색체 이상시험과 설치류를 이용하는 골수 소핵시험의 결과는 전부 음성인 것으로 확인한바 있어 세포 유전독성이 크게 높지 않다는 결과는 보인 바 있다.

또한 최근에 발표된 실험동물에서의 2-bromopropane의 독성조사결과 Sprague Dawley계 흰쥐를 이용하여 28일 동안 복강내 반복투여하여 얻은 결과에 의하면 흰쥐의 수컷 정소 및 세정관의 위축을 확인하였으며 정원세포와 정모세포의 괴사로 정자생성에 현저한 장애를 일어난 동시에 골수

Table 1. Labeling indices of lung, liver and kidney tissue of 2-bromopropane treated and control mouse fetuses and hour bromodeoxyuridine injection

Chemical	Dose (mg/kg)	Number of mouse	Pracenta 2-BP( $\mu$ g/g)	Fetus 2-BP( $\mu$ g/g)	Labeling index(%)		
					Lung	Liver	Kideny
Saline		5	B.D.L.	B.D.L.	20.14 (1.00)	28.74 (1.00)	35.90 (1.00)
2-BP	4,837	5	3.11	1.80	15.26 (0.76)	25.22 (0.88)	33.82 (0.94)
	2,418	5	3.51	2.09	16.27 (0.81)	25.83 (0.90)	33.73 (0.94)
	1,209	5	2.51	0.93	16.54 (0.82)	26.77 (0.93)	32.54 (0.91)
	604	5	5.35	1.08	18.60 (0.92)	28.23 (1.00)	34.67 (0.97)
	302	5	6.44	0.95	19.74 (0.98)	28.11 (0.98)	35.70 (1.00)

2-BP : 2-bromopropane B.D.L. : Below Detectable Level

( ) : Ratio=Treatment/Control

에 적혈구 생성에도 장애를 유발한다는 보고를 한 바 있다.<sup>11)</sup>

또한 김영환 등<sup>12)</sup>은 *umu*-test에 의한 2-bromopropane 유전독성에서 대사활성법과 비대사활성법 모두에서 음성의 결과를 얻은 바 있다.

한편 Tennant 등<sup>13)</sup>은 67종의 발암성물질을 사용하여 Ames 시험에서 양성을 나타내지 않은 비변이·발암성물질의 수가 50% 정도 차지한다는 데 문제점을 제시하면서 비변이·발암성물질에 대한 관심이 크게 부각되기 시작하고 있다.

즉 현재 까지 보고된 Ames test의 결과 1975년 경 발암성물질이 양성으로 나타나는 양성검출율과 또는 비발암성물질이 음성으로 나타나는 음성검출율이 90% 전후인 것으로 McCann 등<sup>14)</sup> Sugimura 등<sup>15)</sup>은 밝힌 바 있다. 최근에는 Ames test의 음성검출율은 90% 정도 유지하고 있으나 양성검출율은 크게 떨어져 50% 전 후인 것으로 Zeigar 등<sup>16)</sup>은 보고 하고 있으며 이러한 현상은 사용하는 검체가 서로 다른데 기인 한다고 알려지고 있다.

즉 Ames test가 개발된 초창기에는 검사의 대

상이 주로 다환방향족탄화수소, 니트로화합물류와 방향족 아민류 등 강력한 발암성물질이 주를 이루고 있었다. 또한 낮은 양성율을 나타내는 검체는 합할로젠유기화합물류와 peroxisome 증식물질 등 발암성이 비교적 낮은 물질로서 이 경우 암수의 성별차 또는 표적장기에 따라 발암성에 차이를 나타내는 물질인 것으로 알려지고 있다. 즉 합할로젠유기화합물의 경우에는 흰쥐의 간세포만을 표적장기로 하는 발암물질이 많은 것으로 알려지고 있으며 peroxisome 증식을 동반하는 발암성물질의 경우에는 Ames test 양성으로 검출되지 않는 것으로 알려지고 있다.<sup>17)</sup> 따라서 연구자들은 Ames 시험에서 양성을 나타내지 않은 비변이·발암성물질의 수가 50% 정도 차지한다는 데 문제점을 제시하면서 비변이·발암성물질에 대한 관심이 크게 부각되기 시작하고 있다.

특히 최근 Uno 등<sup>18)</sup>은 비변이·발암성물질을 어떻게 검출할 것인가의 문제점을 제시하고 연구한 결과 복제 DNA 합성(RDS) 시험법에 관심을 갖게 되었으며 RDS의 유발을 발암프로모터 검출법에 이용하고자 하였다.

즉 세포분열 촉진에 주목하였는데 세포분열을 촉진시키는 화학물질은 발암 프로모터가 조직과 장기에 대하여 보이는 보편적인 생물학적 반응으로서 이해되고 있기 때문에 복제DNA합성 시험을 비변이·발암성을 물질을 확인하기 위한 하나의 시험법으로 주목받고 있다.

BrdU에 의한 RDS test는 *In vitro* 혹은 *In vivo*에서 DNA와 결합한 BrdU를 mouse monoclonal항 BrdU항체를 이용하여 면역조직화학적으로 표식시키고 이 BrdU표식된 세포를 관찰하는 방법으로서 세포 주기 및 세포 재생계의 동태 해석 등에 연구되어지고 있다.<sup>19)</sup> Takahasi(1971)<sup>20)</sup>는 BrdU에 의한 DNA labeling Index에 의해 방광암 세포의 분열주기가 22.9시간임을 보고하였다. 또한 근래에 독성 효과의 평가 수단으로서 세포의 분열주기가 연구되고 있으나 모두 <sup>3</sup>H-thymidine에 의한 방법이다. Hara,<sup>21)</sup> Sakai,<sup>22)</sup> Ward<sup>23)</sup> methyl-nitrosourea, phenobarbital 등이 mouse의 간에서 <sup>3</sup>H-thymidine에 의한 DNA labeling을 감소시킨 것으로 보고하였다. 그러나 <sup>3</sup>H-thymidine에 의한 radiography법에 비하여 특수한 시설과 시간을 요하지 않는 BrdU에 의한 labeling index가 화학물질의 독성 평가 수단으로 널리 이용되고 있다.

본 실험결과 2-bromopropane을 투여한 임신 마우스 태자의 간장, 신장, 폐장 세포의 비정상적인 DNA합성을 확인 할 수 없었으므로 2-bromopropane과 발암성의 관계는 매우 낮을 것으로 사료된다.

## V. 결 론

2-Bromopropane을 투여한 임신 마우스 태자 간장, 폐장 그리고 신장세포에 대하여 태반을 통한 태자에 미치는 영향을 DNA합성세포 표식을 (labeling index, RDS)측정법을 적용하여 실험한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 2-Bromopropane에 의한 마우스 태자의 간, 폐, 그리고 신장세포의 비정상적인 DNA합성을 발견 할 수 없었으므로 2-bromopropane의 태반을 통한 발암관련성은 매우 적을 것으로

예측된다.

2. 태자에 비하여 태반의 2-bromopropane의 농도가 투여량에 따라 최저 1.7에서 최고 6.8배 높음을 확인 하였다.

## 참 고 문 헌

1. 和田攻: 産業化學物質·環境化學物質, 地人書館, 東京, 1991.
2. 노동부·환경부: 기존화학물질목록, 1996.
3. 노동부: 신규화학물질의 유해성조사 및 심사 기준, 1991.
4. 최재욱: 한국의 MSDS제도의 방향, 한국산업위생학회, 1995년도 춘계 학술세미나자료집, 1995.
5. 산업안전선진화 기획단: 산업안전선진화 3개년 계획(안), 1996.
6. 한국산업안전공단 산업보건연구원: 양산 LG전자부품(주) 역학조사최종보고서, 1995.
7. 한국산업안전공단 산업보건연구원: LG전자부품(주) 역학조사 중간보고서, 1995.
8. 立松正衛, 津田洋幸, 伊東信行: BrdUによるDNA 라バリグ法, トキシユロジ-ワオラム, 11, 269-278, 1988.
9. Robert L. Grob: Chromatographic analysis of the Enviroment, and Edition, MARCEL DEKKER. INC, 1990.
10. 유일재, 맹승희: 2-Bromopropane에 대한 변이원성 시험결과보고서, 한국산업안전공단, 산업보건연구원, 1995.
11. 한국산업안전공단 산업보건연구원: 2-Bromopropane에 대한 동물실험 보고서, 1995.
12. 김영환 등: umu-test에 의한 2-Bromopropane의 유전독성조사, 의학기술논집, 22권 1호, 1996.
13. Tennat, R. W., B. H. Margolin, M. D. Shelby, E. Zeiger, J. K. Haseman, J. Spalding, W. Caspary, M. Resnick, S. Stasiewicz, B. Anderson, R. Minor: Predication of chemical carcinogenicity in rodents from in vitro genetic toxicity assays, Science, 263, 933-

- 941, 1987.
14. McCann, J., E. Choi, E. Yamasaki and B. B. Ames : Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test, Assay of 300 chemicals, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 7135-5139, 1975.
  15. Sugimura, T., S. Sato, M. Nagao, T. Yahagi, T. Matsushima, Y. Seino, M. Takeuchi and Kawachi : Overlapping of carcinogens and mutagens, In : Magee, P. N., S. Takayama, T. Sugimura and T. Matsushima(eds), Fundamentals of Cancer Prevention, Baltimore, University Park Press, 191-215, 1976.
  16. Zeiger, E., J. K. Haseman, M. D. Shelby, B. H. Margolin and R. W. Tennant : Evaluation of four in vitro genetic toxicity tests for predicting rodent carcinogenicity, Confirmation of earlier results with 41 additional chemicals, Environ. Mol. Mutagen., 16(Suppl. 18), 1-14, 1990.
  17. Yoshifumi Uno, Yumiko Iwase and Kunie Yoshikawa : From standpoint of mutagenicity test performance, Recommendation of in vivo-in vitro replicative DNA synthesis (RSD) test using rat livers, Environmental Mutagen Research Communications, 14. 1. 1992.
  18. Yoshifumi Uno<sup>a,b</sup>, Hironao Takasawa<sup>a</sup>, Makoto Miyagawa<sup>c</sup>, Yuki Inouea, Taeko Murata<sup>a</sup>, Masuo Ogawa<sup>b</sup> and Kunie Yoshikawa<sup>a</sup> : In vivo-in vitro replicative DNA synthesis (RSD) test using perfused rat liver as an early prediction assay for nongenotoxic hepatocarcinogens : I. Establishment of a standard protocol, Toxicology Letters, 63, 191-199, 1992.
  19. Sugihara, H., Hatton, T. : Immunohistochemical detection of br<sub>2</sub> in formalin-fixed tissue. Histochemistry, 85, 193, 1986.
  20. Takahashi, M., Hogg, G. D. : The automatic analysis of FLM curves. Cell Tissue Kinet, 4, 505, 1971.
  21. Hara, H., Moriki, T., Mixao, M. : Effect of transplacental methylnitrosourea on fetal mouse lung. Cong, Anom., 22, 19, 1982.
  22. Sakai, K., Yamane, Y., Ohtawa, M. : Suppressive effect of aluminium chloride administration on mouse lung carcinogenesis by dimethylnitrosoamine.
  23. Ward, J. M., Hagiwara, A. : The chronic hepatic or renal toxicity of di(2-ethyl hexyl)phtalate, sodium barbital and phenobarbital in male B6CF1 mice, Toxicology Fourm, 8, 221, 1985.