

벤지딘으로 오염된 음용수를 섭취한 흰쥐에서 간장세포과 방광세포에 형성된 발암물질-DNA adduct에 관한 연구

이진현 *† · 신호상 * · 장미선 * · 홍춘표 ** · 최석남 ***
* 공주대학교 환경교육과, ** 화학교육과, *** 화학과

Carcinogen-DNA adducts in Liver and Bladder of Sprague-Dawley rats treated with benzidine in drinking water

Jin Heon Lee *, Ho Sang Shin *, Mi Seon Jang *, Chun Pyo Hong ** and Suk Nam Choi **

*Department of Environmental Education, **Chemistry Education and
***Chemistry, Kongju National University

(Received 7 August 2001 ; Accepted 17 September 2001)

ABSTRACT

To identify and evaluate the benzidine-DNA adducts in liver and bladder, we exposed the 80 ppm benzidine to 40 sprague-dawley rats by drinking water for 4 weeks(6.2 mg/kg body wt./day).

Only one benzidine-DNA adduct was found at the same site of thin layer chromatogram of ³²P-postlabeling method in the liver and bladder of exposed rats. So we know the DNA adduct formed at liver and bladder were similar to each other, which was N-(deoxyguanosin-8-yl)-N'-acetylbenzidine. Relative adduct labeling(RAL) of DNA adduct was similar to each other for 1 and 2 weeks, but that in liver was significantly higher than in bladder for 3 and 4 weeks. RAL × 10⁹ of DNA adduct were 84.45 ± 11.31 and 152.8 ± 5.53 in liver, and were 24.76 ± 7.06 and 38.00 ± 10.57 in bladder for 3 and 4 weeks, respectively. Regression equation between liver and bladder was Y = -3.801 + 2.507 X (r = 0.6036, p < 0.01).

In conclusion, benzidine-DNA adduct formed in liver was significantly higher than that in bladder, with the similar compound structure in sprague-dawley rates treated benzidine in drinking water.

Keywords : Benzidine, DNA adduct, N-(deoxyguanosin-8-yl)-N'-acetylbenzidine, Relative adduct labeling(RAL), Liver, Bladder

I. 서 론

사람들은 18세기 중반까지 천연염료를 사용해오다가 1856년 W. H. Perkin이 키니네(Quinine)의 합성실험 중 aniline의 산화로 azine계의 염기성 염료인 Mauve를 발견한 것이 유기합성 염료의 시초가 되었고, 그 후 1864년에 Peter Gries가 diazo coupling 화학반응을 발견함으로써 현재 사용하고 있는 아조염료와 유기안료를 합성하는 기초를 이룩하여 현재 약 2,000여 종류 이상의 염료와 안료가 사용되고 있다.¹⁾ 1895년 영국의 L. Rehn이 아닐린 제조공장의 근로

자들에게서 방광암이 발생하였다고 보고함에 따라 염료산업에서 방광암의 발생이 최초로 보고되었으며²⁾, 그 후 많은 동물실험과 역학조사를 통하여 벤지딘과 벤지딘을 포함한 방향족 아민류가 방광암의 원인물질임이 밝혀졌다.^{3,4,5)}

벤지딘을 포함한 방향족 아민류가 근로자들에게 발생한 직업성 방광암과 깊이 관련되어 있다는 연구 결과가 보고되면서 이들 물질의 제조와 취급이 1970년대 초반부터 외국 선진국에서는 금지되기 시작하였다.⁶⁾ 그러나 우리나라에서는 이때부터 이들 물질과 관련된 염료와 안료 제조산업이 우리나라로 이주하기 시작하여 본격적으로 시작되어, 1996년에는 52,788톤이 국내에서 생산되었고, 29,289톤이 외국에서 수입되어 국내에서 소비되고 있어 이에 대한 대책이 시급히 요구되고 있다.¹⁾

†Corresponding author : Department of Environmental Education, Kongju National University.
Tel : 041-850-8814, Fax : 041-850-8810
E-mail : ejhl@kongju.ac.kr

우리나라에서는 산업안전보건법의 제37조와 38조를 통하여 염료와 안료제조에서 발암물질로 인정된 벤지딘의 사용을 금지하고 있지만, 디클로로벤지딘과 이를 함유한 물질, 그리고 벤지딘 염산염을 제조할 경우에 허가를 받도록 규정하고 있다. 따라서 1996년에는 생산된 디클로로벤지딘 중에서 약 2,259톤을 외국에 수출하고, 국내에서는 약 600톤 정도를 소모하고 있어서¹⁾, 벤지딘계 염료를 사용하는 근로자들이 벤지딘에 폭로되고 있다고 보고되었다.⁷⁾ 또한 벤지딘계 염료 및 안료가 체내에 흡입된 경우에 체내의 효소(azoreductase)에 의하여 벤지딘이 유리되어 방광암 발생에 대한 가능성이 매우 높은 것으로 보고되고 있어^{6,12)} 이에 대한 연구와 대책이 시급히 요구되고 있다.

현재 발암물질의 폭로와 관련하여 DNA adducts를 발암물질의 생체지표로 활용하기 위한 연구가 활발하며⁹⁾, 특히 표적장기에 폭로된 발암물질을 초기에 발견하기 위한 생체모니터링에 대한 연구가 진행되고 있다.^{9,21,25,26)}

본 연구에서는 벤지딘에 폭로된 흰쥐의 간장세포와 방광세포에서 벤지딘 대사물질에 의해 형성된 DNA adduct를 ³²P-postlabeling방법에 의하여 확인함으로써 벤지딘의 발암성에 대한 표적장기를 확인하였다. 그리고 간장세포와 방광세포에 형성된 벤지딘-DNA adduct의 농도수준과, 폭로시간에 따른 DNA adducts형성의 증가를 분석하고, 두 장기 사이의 회귀관계를 분석함으로써 생체모니터링의 대체 표적장기로 활용할 수 있는지를 확인하였다. 따라서 본 연구의 결과는 벤지딘의 폭로를 파악하기 위해 DNA adduct를 생체지표로 사용하여 생체모니터링할 수 있는 중요한 기준자료로 활용할 수 있다고 생각한다.

II. 연구설계

벤지딘의 표적장기인 간장과 방광조직을 시료로 채취하여 ³²P-postlabeling방법에 의하여 발암물질-DNA adducts를 분석하는 과정은 Fig. 1과 같

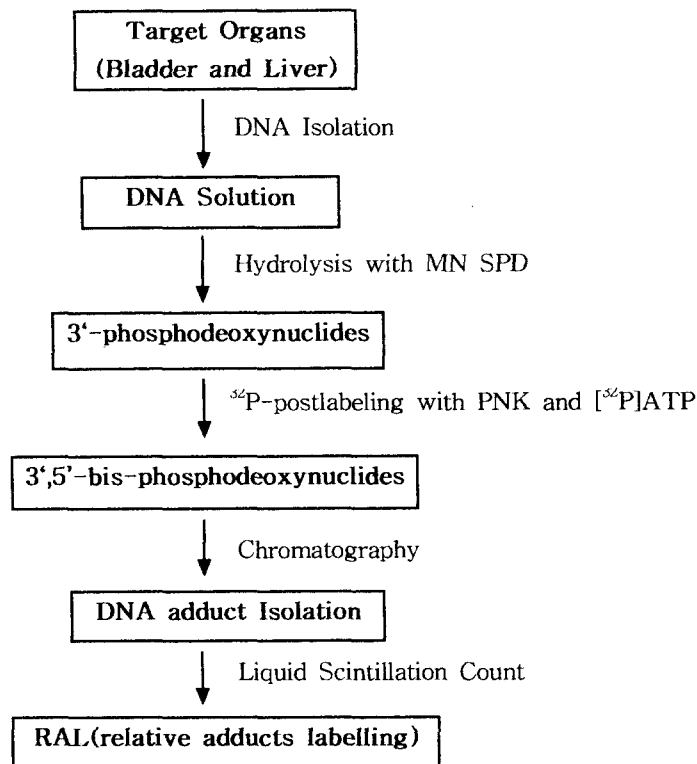


Fig. 1. Procedure of Carcinogen-DNA adduct by ³²P-postlabeling Method MN SPD ; Micrococcal Nuclease Spleen Phosphodiesterase, PNK ; Polynucleotide Kinase.

다.^{9,10,11)} 채취된 조직시료(약 1.0 g)를 조직분쇄기(homogenizer)로 분쇄하고 효소로 단백질과 RNA를 분해하여 DNA를 분리한다. 분리된 DNA는 Micrococcal Endonuclease Spleen Phosphodiesterase(MN SPD)를 사용하여 3'-phosphodeoxy-nuclides로 가수분해시키고, 폴리뉴클리오티드키나제(PNK)와 [³²P]ATP를 사용하여 3',5'-bis-phosphodeoxy-nuclides로 라벨링시킨다(Vodick & Hemminki, 1991). 라벨링된 용액은 2단계에 걸쳐서 크로마토그래피하는데, 첫번째 단계에서는 발암물질-DNA adduct 이외의 모든 3',5'-bis-phosphodeoxy-nuclides를 분리 제거시키고, 두번째 단계에서는 발암물질-DNA adducts를 각 종류별로 분리시켰다. 크로마토그램에 종류별로 분리된 발암물질-DNA adducts들은 필름으로 감광하여 위치를 확인하고, 각 발암물질-DNA adducts의 양(CPM, count per minute)을 액체신틸레이션 계수기(liquid scintillation counter)로 측정하였다. 그리고 발암물질-DNA adducts의 농도는 아래 공식에 의하여 RAL(relative adduct labling)로 나타내었다.

$$RAL = \frac{CPM \text{ adducted nucleotides}}{CPM \text{ unadducted nucleotide}}$$

III. 연구방법 및 실험재료

1. 동물실험

1) 실험동물

Female Sprague-Dawley rats 40마리를 대한 바이오링크에서 공급받아, 일주일 동안 Macrolone cage(온도 18°C, 습도 30~70%)에서 물과 사료를 자유롭게 주며 적응시켰다.

2) 동물실험 방법

동물 실험군은 대조군과 투여군으로 설정하여 각 실험군에 5마리씩 총 40마리를 배정하여 4주 동안 실험을 실시하였다. 대조군은 생수를 음용수로 주었고, 투여군은 80 ppm농도의 벤지딘 용액을 음용수로 공급하였다. 희생시킨 실험동물은 매주 마다 각 실험군에서 5마리씩 무작위로 선택하였으며, 해부를 통하여 간장과 방광 등의 장기를 채취하여 시료로 사용하였다.

2. DNA adduct분석

1) DNA 분리방법

생체시료를 15 ml 시험관(Corex 재질)에서 1,000

μl 1% SDS-1 mM EDTA용액과 24 μl 1 M Tris(pH 7.4)를 넣은 후에 조직분쇄기(Brinkman Homogenizer)로 세포를 분쇄시킨 후에, 24 μl RNase A(10 mg/ml)와 8 μl RNase T₁(5 μg/μl) 그리고 60 μl Proteinase K(10 mg/ml) 등의 효소로 분해시켰다. 그리고 1.2 ml 페놀, 0.6 ml 페놀과 0.6 ml sevag 그리고, 1.2 ml sevag 등에 의하여 DNA를 분리하였다.

분리된 DNA는 100 μl 4 M LiCl용액과 10 μl glycogen(30 μg/μl) 그리고 냉동된 100% 에틸알코올에 의하여 확인하였고, 40 μl의 1% SSC-1 mM EDTA용액으로 용해시켜 DNA의 stock용액으로 사용하였다.

2) DNA 가수분해 방법

1.5 ml Eppendorf 튜브에 4 μl stock용액을 채취하고, 2 μl MN((Micrococcal Nuclease) SPD(Spleen Phosphodiesterase), 2 μl 5 X salt(pH 7.0), 2 μl H₂O로 6 μl 혼합용액(cocktail solution)을 만들어 첨가한 후에 37°C에서 DNA를 가수분해하였다.

3) DNA adduct추출 방법

DNA adducts를 추출하기 위하여 가수분해가 완료된 시료에 5 μl의 10 mM TBA(tetrabutylammonium)을 시료와 섞이지 않도록 표면 위에 첨가하고, 0.1 M NH₄ Formate, pH 3.5와 증류수의 혼합물을 혼합한 후에 증류수로 포화시킨 부탄올(n-butanol)로 DNA adduct를 추출하였다. 부탄올로 추출된 시료는 완전히 건조시킨 후에 10 mM Bicine, pH 9.6에 용해시켜 ³²P라벨링 용액으로 사용하였다.

4) ³²P-postlabeling방법

³²P-postlabeling은 추출된 DNA adduct용액에 0.28 μl Polynucleotide Kinase(PNK), 1.5 μl PNK buffer, 그리고 10 mM Bicine(pH 9.6)를 넣고 40~50 μ Ci[γ -³²P]ATP를 첨가한 후에 37°C에서 ³²P-postlabeling을 실시하였다.

5) 크로마토그래피 방법

박막 이온교환 크로마토그래피(TLC)를 이용하여, 먼저 ³²P-postlabeling된 시료에서 발암물질로 형성된 DNA adducts를 분리하고, 다음은 DNA adducts를 종류별로 분리하였다. 첫째 단계에서는 D1용매(0.65 M NaH₂PO₄, pH 6.0)로 18시간 동안 크로마토그래피하여 분리하였고, 둘째 단계에서는 D3용액(3.6 M Lithium Formate, 8.5 M Urea, pH 3.5), D4용액(0.8 M LiCl, 0.5 M Tris-HCl, 8.5 M Urea, pH 8.0), D5용액(1.5 M 0.65 M NaH₂PO₄, pH 6.0) 등의 용매를 사용하여 크로마토그래피하였다.

6) DNA adduct 측정방법

TLC상에 분리된 DNA adducts는 필름을 사용하여 위치를 확인하고, 액체 신틸레이션 계수기(liquid scintillation counter)로 CPM(count per minute)를 측정하여 RAL(relative adducts labeling)를 계산하였다.

IV. 연구 결과

1. 장기에 형성된 DNA adduct

80 ppm의 벤지딘에 오염된 음용수를 4주 동안 섭취한 흰쥐(6.2 mg/kg body wt./day)의 간장세포와 방광세포에 형성된 DNA adduct를 ^{32}P -postlabeling 방법에 의하여 분리하여 확인한 결과는 Fig. 2와 같다. A와 B는 1주와 4주 동안 벤지딘에 폭로된 흰쥐의 간장세포에 형성된 DNA adduct이고, C와 D는 1주와

4주 동안 벤지딘에 폭로된 흰쥐의 방광세포에 형성된 DNA adduct이다. 이들 모두 1개의 DNA adduct가 형성되었는데, 크로마토그램에 의하여 분리된 위치에 동일하였고, DNA adduct의 크기가 폭로시간에 비례하며 커지는 경향을 나타내었다.

2. DNA adduct의 농도수준

4주 동안 80 ppm의 벤지딘이 오염된 음용수를 섭취한 흰쥐의 장기에 형성된 DNA adduct의 RAL(relative adduct labeling)은 Fig. 3과 같다. 간장과 방광에 형성된 DNA adduct의 RAL $\times 10^9$ 값이 1주와 2주에는 각각 6.8과 10.1, 28.2와 24.8로 비슷한 수준으로 형성되었다. 그러나 3주와 4주에는 간장에서 84.5와 152.8인 반면에 방광에서는 29.4와 38.0으로 형성되어서, 간장에 형성된 DNA adduct의 RAL이 방광의 RAL에 비하여 약 3.0~4.1배 높게 나타났다

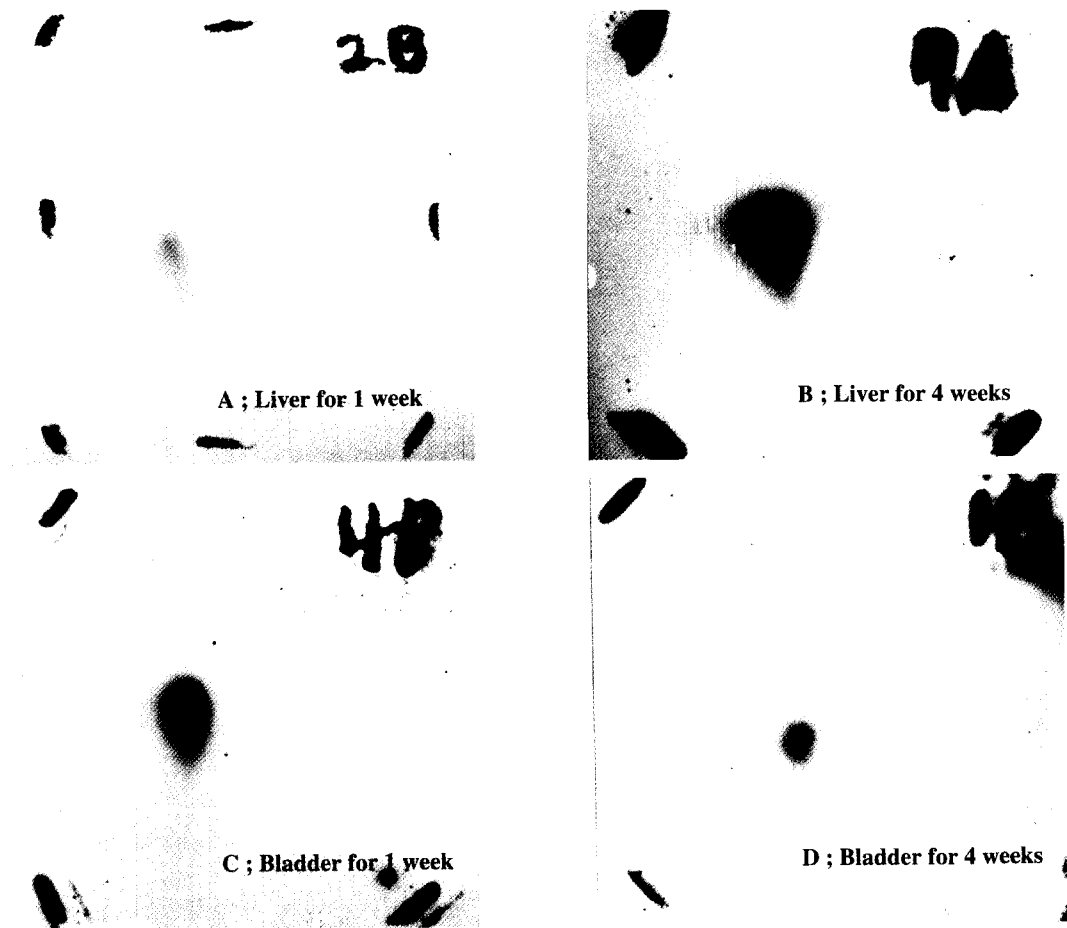


Fig. 2. Chromatogram of benzidine-DNA adduct in liver and bladder of sprague-dewley rats treated with benzidine in drinking water by ^{32}P -postlabeling method for 4 weeks.

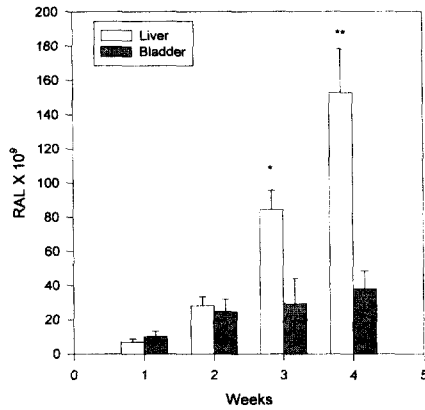


Fig. 3. DNA adducts of Liver and Bladder isolated from Sprague-Dawley rats treated for 4 weeks with 80 ppm benzidine in the drinking water.
 **, *; Very, significantly different RAL between Liver and Bladder.

($p < 0.01$). 따라서 폭로시간이 증가함에 따라 각 장기에 형성되는 DNA adduct의 RAL이 간장세포에서는 높은 수준으로 증가하였지만, 방광세포에서는 낮은 수준으로 증가하였다.

3. 간장과 방광에 형성된 DNA adduct의 상관관계

Fig. 4는 80 ppm의 벤지딘이 오염된 음용수를 4주 동안 섭취시킨 흰쥐의 간장과 방광에 형성된 DNA adduct의 RAL을 상관관계로 나타낸 것이다. DNA adduct의 $RAL \times 10^9$ 가 $Y = -3.8016 + 2.5074X$ (Y : 간장세포, X : 방광세포)의 방정식에 의하여 간장과 방광에 형성되었고, 회귀계수는 0.6036 ($p < 0.01$)이었다.

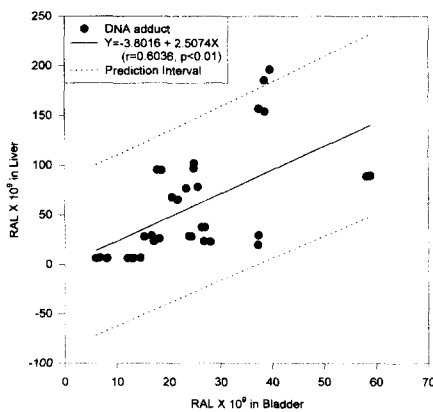


Fig. 4. Regression of DNA adducts isolated from between Liver and Bladder of Sprague-Dawley rats treated for 4 weeks with 80 ppm benzidine in the drinking water.

V. 고 찰

근로자들에 폭로된 것을 감시할 수 있는 생체지표 (biomarker)로 BEIs (biological exposure indices)를 사용하고 있으며¹³⁾, 발암물질의 생체모니터링을 위해서는 발암물질에 의하여 형성된 DNA adducts가 가장 적합한 생체지표로는 인정되고 있다. 그것은 인체에 폭로된 대부분의 발암물질이 암으로 진행되기 위해서는 반드시 DNA adducts를 형성하며, 동시에 이 시점에서 폭로를 중단하여 DNA adducts수준을 낮추면 암으로 진행되는 확률을 크게 낮출 수 있기 때문이다.⁹⁾ 따라서 발암물질의 폭로에 의하여 DNA adducts가 형성되는 표적장기를 선택하는 것이 매우 중요하다.

벤지딘은 방향족 아민류의 대표적인 발암물질로서, 사람, 흰쥐, 햄스터, 마우스 등에 대하여 강력한 발암물질로 알려져 있다.^{14,15,16)} 또한 역학조사를 통하여 Yoshida 등¹⁷⁾과 Yoshida & Miyakawa¹⁸⁾ 등은 벤지딘계 염료가 방광암의 발생을 증가시킨다고 보고하였다. Bi 등¹⁹⁾도 벤지딘에 폭로된 근로자들에게서 방광암의 발생율이 25배 높다고 보고하였다. 따라서 벤지딘의 폭로에 의하여 방광조직에 형성되는 DNA adducts에 대한 연구가 필요함과 동시에 기타 표적장기에 대한 DNA adduct에 대한 연구가 필요하다.

본 연구에서 벤지딘을 음용한 흰쥐의 간장세포와 방광세포에서 형성된 DNA adducts를 ³²P-postlabeling방법으로 분리한 결과에서 오직 한 개의 DNA adduct가 분리되었고, 또한 이들 DNA adduct의 TLC상 위치도 동일하였다(Fig. 2). 이것은 벤지딘이 폭로되었을 때 간장조직과 방광조직에 형성되는 DNA adduct가 동일한 물질임을 확인해 주는 것이다. 즉 벤지딘의 표적장기는 방광조직뿐만 아니라 간장조직도 해당되며, 간장조직에 형성된 DNA adduct도 방광조직에서와 동일하게 N-(deoxyguanosin-8-yl)-N'-acetylbenzidine임을 확인할 수 있다.^{8,20,21)}

일반적으로 위장관을 통하여 인체에 발암물질이 폭로되면 간장에 이동되어 대사작용에 의하여 대사물질로 변환 후에 배설된다. 방향족 아민류도 체내에 흡수되면 간장에서 아세틸화된 대사물질이 되어 배설되는데, 이러한 N-acetylation은 무독화 과정으로 알려져 있다.^{21,22)} 그러나 벤지딘의 경우에는 아세틸화 반응이 오히려 독성화되는 과정으로 밝혀지고 있다. 즉 간장에서 효소작용(cytochrome P-450)에 의하여 아민기가 아세틸화되어 방광으로 배설되면 prostaglandin-H synthetase에 의하여 활성화되어

방광 상피조직의 DNA와 결합하게 되어 방광암을 발생하기 때문인 것으로 보고하였다.^{20,23)} 이러한 현상은 몇몇 연구결과에서 벤지딘의 폭로에 의하여 방광 상피세포에 형성된 N-(deoxyguanosin-8-yl)-N'-acetylbenzidine을 측정하여 확인하였다.^{8,20,21)} 또한 본 연구의 결과는 이들의 연구결과와 일치하였다. 80 ppm의 벤지딘을 3주와 4주 동안 음용시킨 흰쥐의 방광세포에서 DNA adduct의 RAL $\times 10^9$ 가 29.4와 38.0만큼 형성되었다. 이와 함께 본 연구결과에서는 벤지딘을 음용시킨 흰쥐의 간장세포에서 DNA adduct가 매우 많이 형성되었다. 3주와 4주 동안 80 ppm의 벤지딘을 음용시킨 흰쥐의 간장세포에서 DNA adduct의 RAL $\times 10^9$ 가 각각 84.5 ± 11.31 와 152.8 ± 5.53 만큼 형성되었다. 더욱이 간장세포에 형성된 DNA adduct의 수준이 방광세포에 비하여 약 3.0~4.1배 높았다(p<0.01). 이것은 벤지딘의 폭로에 의하여 간에서 암이 발생할 확률이 방광에서 보다 약 3.0~4.1배 높을 수 있음을 의미한다. 또한 이것은 간장에서 효소작용(cytochrome P-450)에 의하여 대사된 아세틸벤지딘이 방광으로 배설되기 이전에 간장세포와 결합하여 DNA adduct를 형성하고 있음을 말해준다.²⁰⁾

발암물질의 폭로를 생체모니터링하기 위하여 갖추어야 할 필수조건은 시료채취가 가능해야 한다. 간장세포는 심부에 위치하고 있기 때문에 직접 간장세포의 시료를 채취가 어렵다. 그러나 방광세포는 상피세포가 매일 약 105~106개씩 정기적으로 탈락되어 뇨와 함께 배설되기 때문에 시료채취가 가능하다.²⁵⁾ 또한 ³²P-postlabeling방법은 107~1010개의 정상 뉴클레오티드에서 하나의 DNA adduct를 분석할 수 있기 때문에 뇨 중 상피세포는 방광암을 비관혈적으로 모니터링하는데 매우 유용한 생체시료로 사용할 수 있다.^{24,25)} 따라서 방광세포와 간장세포에 형성된 DNA adduct의 상관관계를 정립하면 하나의 조직에 형성된 DNA adduct 수준을 통하여 다른 하나의 조직에 형성된 DNA adduct수준을 예측할 수 있다. 본 연구결과에서 벤지딘을 음용시키었을 경우에 DNA adduct의 RAL $\times 10^9$ 가 Y=-3.8016+2.5074X(Y ; 간장, X ; 방광)의 회귀방정식으로 나타낼 수 있었으며, 회귀계수는 0.6036(p<0.01)이었다. 이 관계식을 이용하여 뇨중 상피세포에 형성된 벤지딘의 DNA adducts 수준을 측정하여 간장세포에 형성된 DNA adduct수준을 예측할 수 있다고 생각된다. 현재 Talaska 등^{9,25)}과 이 등⁸⁾이 뇨로 배설되는 상피세포(exfoliated urothelial cells)에서 DNA adducts를

³²P-postlabeling방법으로 분석하여 발암물질에 의하여 각 장기조직에 형성되는 DNA adduct를 비관혈적으로 생체모니터링하여 발암물질에 의한 암 발생을 예방하고자 노력하고 있다.

VI. 결 론

벤지딘에 의하여 간장과 방광세포에 형성되는 DNA adduct를 확인하고 분석하기 위하여 sprague-dewley계 흰쥐에게 80 ppm의 벤지딘이 오염된 음용수를 4주 동안 음용시키었다(6.2 mg/kg body wt./day). 벤지딘에 폭로된 흰쥐의 간장과 방광세포에 형성된 DNA adduct를 ³²P-postlabeling방법으로 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

흰쥐의 간장과 방광세포에서 오직 한 개의 DNA adduct가 분리되었고, 박막 이온교환 크로마토그램(TLC)에서 동일한 지점에 위치하고 있었다. 따라서 간장세포에 형성된 DNA adduct도 방광세포에서와 동일하게 N-(deoxyguanosin-8-yl)-N'-acetylbenzidine임이 확인되었다. DNA adducts의 RAL $\times 10^9$ 가 4주 동안 간장세포에서 매주 6.84 ± 2.00 , 28.19 ± 5.23 , 84.45 ± 11.31 그리고 152.81 ± 5.53 등으로 형성되었고, 방광세포에서는 매주 10.11 ± 3.07 , 24.76 ± 7.06 , 29.36 ± 14.78 , 그리고 38.00 ± 10.57 등으로 형성되었다. 따라서 벤지딘의 폭로에 의하여 형성된 DNA adducts는 1주에 방광에서 약간 많이 형성되었지만, 2주부터는 간장에서 높게 형성되었고, 3주와 4주에는 방광세포에 비해 간장세포에서 매우 유의한 차이로 많이 형성되었다. 그리고 방광세포와 간장세포 사이의 DNA adducts 형성에 관한 회귀방정식은 Y=-3.801+2.507 X(r=0.6036, p<0.01)의 관계로 나타났다(Y ; 간장세포, X ; 방광세포).

결론적으로 벤지딘이 음용수에 오염되었을 경우에 DNA adduct의 형성이 간장세포와 방광세포에서 동일한 화합물로 확인되었고, 폭로시간이 연장됨에 따라 간장세포에서 매우 급격하게 증가하였으며, 간장세포와 방광세포 사이에는 일정한 회귀관계가 있음이 확인되었다.

참고 문헌

- 1) CIS, Korea : 한국정밀화학총람(Korea Fine & Speciality Chemical General Book), CIS (Chemical Information Services), 165-240, 1998.

- 2) Cohen, S. M. ; Promotion in urinary bladder carcinogenesis, *Environmental Health Perspectives*, 50 : 51-59, 1983.
- 3) Case, R. A. M., Hosker, E. H., McDonald, D. B. and Pearson, J. T. ; Tumors of the urinary bladder in workman engaged in the manufactured and use of certain dyestuffs intermediates in the British Chemical Industry, Part I. The role of aniline, benzidine and β -naphthylamine, *British J. of Industrial Medicine*, 11 : 75-96, 1954.
- 4) Clayson, D. B. and Cooper, E. H. ; Cancer of the urinary tract, *Adv. Carcer Res.*, 13 : 271-381, 1970.
- 5) Paul, A. S., Ringen, P. H., George, P. H., Ernest, B. A., Warren, H. G., Sandra, T., William, C. A., John, H.C. and Roy, W. ; Risk factors for bladder cancer in cohort exposed to aromatic amines, *Cancer*, 58 : 2156-2161, 1986.
- 6) NIOSH : Special occupational hazard review for benzidine-based dyes, US Dept. Of Health, Education and Welfare, Public Health Service, Center for Disease Control, National Institute for Occupational Safety and Health(NIOSH), 1-60, 1980.
- 7) 노재훈, 안연수, 김규상, 김치년, 김현수 : 벤지딘계 염료제조 사업장 근로자의 폭로, *대한산업의학회지*, 7(2), 103-109, 1995.
- 8) 이진현, 신호상, 김양호, 노재훈, 이범규 ; GC/MS-SIM과 ^{32}P -postlabeling방법에 의한 염료와 안료를 제조하는 사업장 근로자들의 방광암 조기발견을 위한 biomarker개발에 관한 연구, *한국환경위생학회지*, 26(1), 36-44, 2000.
- 9) Talaska, G., Roh, J. H. and Getek, T. ; ^{32}P -postlabeling and mass spectrometric methods for analysis of bulky, polyaromatic carcinogen-DNA adducts in humans, *J. Chromatography*, 580 : 293-323, 1992.
- 10) 노재훈, 이진현, Glenn Talaska : 발암 물질의 생체 모니터링, *군자출판사*, 1998.
- 11) 이진현 : 개량된 ^{32}P -postlabeling에 의한 발암물질-DNA adducts의 생물학적 모니터링 방법에 대한 연구, *공주대학교 환경연구*, 7 : 21-36, 1999.
- 12) Frederick, C. B., Weis, C. C., Flammang, T. J., Matin, C. N. and Kadlubar, F. F.(1985) Hepatic N-oxidation, acetyl-transfer and DNA-binding of the acetylated metabolites of the carcinogen, benzidine. *Carcinogenesis*, 6, 959-65.
- 13) ACGIH. TLVs and BELS-Threshold Limit Values for chemical substances and physical agents, Biological exposure indices, OH, 1999.
- 14) Gehrmann G. H. ; The carcinogenetic agent-Chemistry and industrial aspects, *J. Urol.*, 31 : 126-137, 1934.
- 15) Clayson D. B. ; Occupational bladder cance, *Prev. Med.*, 5 : 228-244, 1976.
- 16) Halyes T. J. ; Benzidine revised-A review of the literature and problems associated with the use of benzidine and its congeners, *Clin. Toxicol.*, 8 : 13-42, 1975.
- 17) Yoshida, O., Harada, T., Miyagawa, M., Kato, T. ; Bladder cancer in workers of the dyeing industry, *Igaku No Ayumi*, 79 : 421-422, 1971(Jap.)
- 18) Yoshida, O., Miyakawa, M. ; Etiology of bladder cancer-Metabolic aspects, in Nakohara, W., Hirayama, T., Nishioka, K. and Sugano, H.(eds) : Analytical and experimental epidemiology of cancer, *Proceedings of the 3rd International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund*, Baltimore, University Park Press, 31-39, 1973.
- 19) Bi, W., Hayes, R. B., Fenf, P., Qi, Y., You, X., Zhen, J., Zhang, M., Qu, B., Fu, Z., Chen., M., Co Chien, H. T. and Blot, W. J. ; Mortality and incidence of bladder cancer in benzidine-exposed workers in china, *American J. of Industrial Medicine*, 21 : 481-489, 1992.
- 20) Frederick, C. B., Weis, C. C., Flammang, T. J., Martin, C. N. and Kadlubar, F. F. ; Hepatic N-oxidation, acetyl-transfer and DNA-binding of the acetylated metabolites of the carcinogen, benzidine, *Carcinogenesis*, 6 : 959-965, 1985.
- 21) Rothman, N., Bhatnagar, V. K., Hayes, R. B., Zenser, T. V., Kashyap, S. K., Butler, M. A., Bell, D. A., Lakshmi, V., and Talaska, G. ; The impact of interindividual variation in NAT2 activity on benzidine urinary metabolites and urothelial DNA adducts in exposed workers, *Proc. Natl., Acad. Sci.*, 93 : 5084-5089, 1996.
- 22) Meyer, U. A. ; Polymorphism of human acetyltransferases, *Environ. Health Perspect.*, 102

- : 213-216, 1994.
- 23) Kadlubar, F. F., Miller, J. A. and Miller, E. C. ; Hepatic microsomal N-glucuronidation and nucleic acid binding of N-hydroxylamines in relation to urinary bladder carcinogenesis, *Cancer Res.*, 37 : 805-814, 1977.
- 24) Philips, D. H., Hemminki, K., Alhonen, A., Hewer, A. and Grover, P. L. ; Monitoring occupational exposure to carcinogens : Detection by ³²P-postlabeling of aromatic DNA adducts in white blood cells from iron foundry workers, *Mutat. Res.*, 104 : 531-541, 1988 Reddy, M. V. and Randerath, K., *Carcinogenesis*, 7 : 1543, 1986.
- 25) Talaska, G., Dooley, K. L. and Kadlubar, F. F. ; Detection and characterization of carcinogen-DNA adducts in exfoliated urothelial cells from 4-aminobiphenyl-treated dogs by ³²P-postlabeling and subsequent thin-layer and high-pressure liquid chromatography, *Carcinogenesis*, 11(4) : 639-646, 1990.
- 26) Martin, C. N., Beland, F. A., Roth, R. W. and Kadlubar, F. F. ; Covalent binding of benzidine and N-acetylbenzidine to DNA at C-8 atom of deoxyguanosine in vivo and in vitro, *Cancer Research*, 42 : 2678-2696, 1982.