

Aluminum oxide, calcium oxide, sodium tetraborate 처리에 의한 설치류 골수세포의 소핵유발 연구

임경택*, 김수진, 김종규, 강민구, 김현영, 양정선

한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 화학물질안전보건센터

A Study of Mammalian Erythrocyte Micronucleus Induction with Aluminum Oxide, Calcium Oxide, Sodium Tetraborate

Kyung-Taek Rim*, Soo-Jin Kim, Jong-Kyu Kim, Min-Gu Kang,
Hyeon-Yeong Kim and Jeong-Sun Yang

Chemical Safety & Health Center, Occupational Safety & Health Research Institute,
Korea Occupational Safety & Health Agency, Daejeon 305-380, Korea

ABSTRACT

We have investigated the genotoxicity of 3 chemicals, aluminum oxide, calcium oxide, sodium tetraborate using mammalian erythrocyte with micronucleus induction. It was performed using 9 week male ICR mice. At 24 hours after treatment with 3 chemicals with oral route, mice were sacrificed and bone marrow cells were prepared for smear slides. As a result of counting the micronucleated polychromatic erythrocyte (MNPCE) of 2,000 polychromatic erythrocytes (PCE), all treatment groups did not show statistically significant increase than negative control group. And there was no clinical sign related with injection of the 3 chemicals. It was concluded that the 3 chemicals did not induce micronucleus in the bone marrow cells of ICR mice, and these results indicate that the 3 chemicals have no mutagenic potential under the condition in each studies.

Key words : mammalian, erythrocyte, micronucleus induction, aluminum oxide, calcium oxide, sodium tetraborate

서 론

산업구조가 다양화됨에 따라 화학물질 사용량 및 종류가 폭발적으로 증가되고 새로운 화학물질이 수입 또는 개발되고 있으며, 이들 물질의 혼합

제품은 수십 만 종에 달하고 있는 상황이다. 이에 따른 부작용으로 독성이 높은 유해화학물질의 수요는 급증하고 있음에도 유해성이 검증도 되기 전에 생산 공정에서 사용되고 있는 실정이다. 또한, 대부분의 화학물질은 유해성 자료가 없는 채로 유통되고 있어 취급근로자에게 직업병, 화재·폭발, 맹독성 물질에 의한 질식 등의 사고가 빈발하고 있다(황호순, 2000).

따라서 현행 화학물질관리체계에 대한 국가주도

* To whom correspondence should be addressed.
Tel: +82-42-869-0345, Fax: +82-42-863-9001
E-mail: ktrim@kosha.net

의 종합적이고 체계적인 새로운 관리방안이 절실히 필요하고, 모든 화학물질은 잠재적으로 유해하다는 관점에서 볼 때 화학물질을 유해성별로 분류하여 적절하게 사전 예방하는 것이 무엇보다 중요한 과제이다. 이를 위해서는 그 화학물질의 유해성을 충분히 숙지하여야 만약의 사고에 신속히 대응할 수 있게 된다. 특히 화학물질로 인한 사고는 직업병, 화재·폭발 등으로 인한 피해에서 보듯이 그 회복이 극히 어렵다는 점에서 매우 심각하다고 할 수 있다(임경택 등, 2007).

대표적인 금속산화물인 aluminum oxide는 기존 화학물질목록에 KE-01012로 등재되어 있으며, 산업안전보건법 상의 노출기준설정물질이지만, 기타 국내의 관련법의 규제대상이 아니며, 미국물품목록인 TSCA에만 등재되어 있다. 알루미늄과 알루미늄염은 의료용으로는 제산제, 설사제 및 보호용 피부 연고에 사용되고 화장품 및 데오도란트에도 사용된다(National Research Council, 1981). Calcium oxide는 기존화학물질목록에 KE-04588로 등재되어 있고, 산업안전보건법 상의 노출기준설정물질이지만 기타 국내의 관련법의 규제대상이 아니며, 미국물품목록인 TSCA에만 등재되어 있으며, 유럽연합 규정인 EC 분류에는 부식성물질로 구분되어 있다. Sodium tetraborate는 기존화학물질목록에 KE-12384로 등재되어 있으며, 산업안전보건법 상의 노출기준설정물질이지만, 기타 국내의 관련법의 규제대상이 아니며, 미국물품목록인 TSCA에만 등재되어 있다. 또한 Rat를 이용한 급성경구독성시험결과 LD₅₀이 1,200 mg/kg로 알려져 있다.

이와 같이 aluminum oxide, calcium oxide, sodium tetraborate는 급성독성자료가 불충분하며 그 유해성의 정확한 평가가 이루어지지 못한 물질로 노출로 인해 호흡기계 이상 등의 위험이 증가될 수 있는 물질이어서 정확한 유해성의 평가가 필요하였다.

따라서 본 연구에서는 국내에서 사용되는 화학물질 중 국내외적으로 급성독성자료가 불충분하며 그 유해성의 정확한 평가가 이루어지지 못한 물질로 사용량과 취급 근로자수가 많아 노출로 인해 호흡기계 이상 등의 위험이 증가될 수 있는 물질로 정확한 유해성의 평가가 필요한 aluminum oxide, calcium oxide, sodium tetraborate 등의 3개 화학물질에 대해 유전독성연구 중 설치류 골수세포를 이용한 소핵유발 연구를 통하여 발암성 및 변이원성

의 예측 등에 활용하고자 하였으며, 동 화학물질의 소핵유발 유무를 설치류인 ICR계 마우스의 골수세포를 이용하여 예측하고자 국립환경과학원(제2007-29호)과 노동부(제2008-11호)의 해당 고시 및 OECD Test Guideline No. 474(1997)을 충족하는 설치류 골수세포를 이용한 소핵유발 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 화학물질 및 시약

본 시험에 사용한 aluminum oxide(CAS No. 1344-28-1, 99.998%, Lot No. 04301BH), calcium oxide(CAS No. 1305-78-8, 99.99+%, Lot No. 08788KH), sodium tetraborate(CAS No. 1330-43-4, 99.998%, Lot No. 04313HE)는 Sigma-Aldrich(St. Louis MO., USA)사에서 구입하여 사용하였다. 음성대조물질(용매)은 1% CMC(Carboxymethylcellulose sodium salt, CAS No. 9004-32-4, Sigma-Aldrich, USA, 99.5%, Lot No. 037K0766)를 사용하였다. 양성대조물질은 소핵유발연구에서 흔히 사용되는 양성대조물질로 소핵유발연구 결과자료가 다량 존재하는 Mitomycin C(MMC; CAS No. 50-07-7, Sigma-Aldrich, USA, 생화학용 등급, Lot No. 094K0493)을 선정하였고, 양성대조물질의 투여는 복강투여로 수행하였다.

2. 실험동물의 군 배정 및 사육조건

소핵유발연구에 사용한 동물은 SPF(specific pathogen free) ICR 계통 수컷 마우스(Japan SLC, Inc., 중앙실험동물(주))를 사용하였으며, 도입 시 생후 7주령, 투여 시 생후 9주령이었다. ICR 마우스는 소핵유발연구에 널리 사용되고 있으며 소핵유발연구에 대해 축적된 데이터가 많다. 본 시험은 국립환경과학원 고시에 기초하여 각 군당 수컷 6마리씩을 사용하였다.

본시험에서의 투여농도와 골수채취시기를 결정하기 위한 예비시험에서는 시험군을 음성(용매)대조군 1군, 투여군 3군, 양성대조군으로 구성하되, 이를 다시 각각 투여 후 골수채취까지의 시간에 따라 24시간 군, 48시간 군으로 나누어 모두 10군을

구성하여 각 군당 3마리씩 총 30마리의 마우스를 사용하였다.

본시험에서는 예비시험의 결과를 토대로, 최고농도를 2,000 mg/kg b.w.으로 하여 음성(음매)대조군 1군, 투여군 3군(500 mg/kg b.w., 1,000 mg/kg b.w., 2,000 mg/kg b.w. 투여군) 및 양성대조군으로 구성하되, 이를 다시 각각 투여 후 24시간 시험용, 5군을 구성하여 각 군당 6마리의 마우스를 사용하였다(Table 1, 3, 5).

순화 후 이상의 소견이 있는 동물을 제외시키고, 체중을 지표로 하여 층화임의추출방법으로 군 분리를 수행하되, 체중 측정용 전자저울로부터 직접 컴퓨터로 전송받은 자료를 Microsoft-EXCEL의 매크로 기능 및 Visual-Basic 기능을 이용하여 체중순으로 배열, 군 수 만큼 rank를 나누어 각 rank내에서 임의추출하는 층화임의추출방식에 따라 수행하였으며, 임상관찰에서 이상을 나타내었던 동물은 군 분리에서 제외시켰다.

검역은 동물 도입 시 수행하였으며 순화기간은 11일로 하였다. 동물개체는 꼬리부분에 유성펜으로 표시하여 식별하였고, 케이지에도 식별번호를 부착하였다. 사용동물실의 입구에는 시험번호, 시험제목, 동물실 사용기간, 시험책임자명 등을 기재한 동물실 사용현황을 부착하였다.

3. 투여기간 및 체중측정방법

군 분리 후 동물개체의 꼬리에 도입 시 사용한 것과 다른 종류의 칼라표식을 하였다. 체중측정은 도입 시, 군 구성 및 투여 시에 측정하되 표준분동으로 정도관리 된 전자저울을 이용하여 동물식별번호에 따라 한 마리씩 측정하여 연결된 컴퓨터의 Microsoft-EXCEL을 이용하여 체중기록결과를 정리하였다.

실험동물 사육의 환경조건은 온도: 22±3°C, 습도: 50±20%, 조도: 150~300 Lux, 명암주기: 12시간 점등(AM 08:00~PM 20:00) 및 12시간 소등(PM 20:00~AM 08:00), 환기회수: 12~15회/시간, 케이지내 동물수용방법은 폴리설피온(PS: Polysulfone) 케이지에 각각 6마리씩 수용하는 것으로 하였고 시험에 악영향을 미친 요인은 없었다.

시험동물사료는 고형배합사료(Pico Lab 5053 diet (Labdiet), P. O. Box 66812, St. Louis, MO 63166-

6812, USA. 오리엔트)로 자유섭취 시켰다.

음용수는 수돗물을 1차 여과하여 공급(RO수)하였고 음용수 허용기준내의 음용수를 이용, 급수통에서 자유섭취 시켰다. 수질분석은 (주) 동우엔지니어링 동우환경기술연구원에 의뢰하여 수행하였다.

4. 화학물질의 조제 및 투여

본 연구는 국립환경과학원 고시 제2007-29호에 준하여 수행하되, OECD시험가이드라인(1997, TG 474), 林 眞(1991) 및 Schmid(1975)의 방법에 준하여 수행하였다. 최고의 조제농도인 1% CMC(Carboxymethylcellulose sodium salt) 용액에 맞추어 화학물질 적량을 용해시킨 것을 동일한 용매로 단계 희석하여 사용하였다. 조제된 화학물질의 투여량은 예비시험의 경우 경구투여의 일반용량인 10 mL/kg b.w.로 수행하였으나 시험물질이 용매에 충분히 녹지 않아, 본시험에서는 20 mL/kg b.w.로 증량하여 경구투여 하였다. 시험농도를 결정하기 위한 예비시험의 결과를 토대로 본시험을 수행하였으며, 본시험의 농도는 2,000 mg/kg b.w.을 최고농도로 하여 공비 2의 3개 농도군(2,000 mg/kg b.w., 1,000 mg/kg b.w., 500 mg/kg b.w.) 및 음성대조군(CMC, 20 mL/kg b.w.), 양성대조군(MMC, 10 mL/kg b.w. 복강투여)에 대한 소핵유발 연구를 수행하되 aluminum oxide 등 3개의 화학물질은 1회 경구투여 하였다.

5. 골수 채취 및 검체 제작

화학물질 투여 24시간 후 경추 탈골하여 되도록 혈액이 묻지 않게 하여 대퇴골을 적출하였다. FBS(Fetal Bovine Serum; Hyclone, Lot No. KRA25245)를 사용하여 골수세포를 원심관에 씻어 모았다. 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액은 버리고 소량의 FBS로 세포를 다시 현탁시키고, 세포현탁액을 slide glass에 도말하여 실온에서 건조시킨 후 메탄올로 5분간 고정하였다. 골수세포증식을 관찰하기 위해, 즉 전체적혈구 중 다염성적혈구의 비율을 관찰하기 위해서는 메탄올 고정시킨 표본을 4% Giemsa액에 염색하였으며, 다염성적혈구에 생성된 소핵을 관찰하기 위해서는 메탄올 고정시킨 표본에 acridine orange(40 µg/mL)로 점적하여 cover

glass를 덮어 염색하였다.

6. 소핵의 계수 및 판정기준

표본의 관찰은 맹검법(blind method)에 의해 하였으며, 400배 이상 배율에서 골수세포증식은 광학 현미경으로 다염성적혈구에서의 소핵은 BA-2 filter가 장착된 형광현미경으로 관찰하였다. 골수세포의 증식현상을 관찰하기 위해서는 세포의 도달상태가 좋은 곳을 선택하여 전체 적혈구(다염성 적혈구 및 정염성 적혈구) 약 500개를 관찰하여 그 중 다염성적혈구의 비율을 측정하였다. 소핵빈도를 관찰하기 위해서는 다염성적혈구(Polychromatic erythrocytes, PCE) 약 2,000개에서 소핵을 갖는 세포를 계수하였다.

Giemsa 염색한 표본에서의 다염성적혈구는 핵이 없이 열린 청색 빛을 나타내는 적혈구를 다염성적혈구로 하였으며, acridine 염색한 표본에서의 다염성적혈구는 관찰시야에서 핵이 없이 적색 형광빛을 나타내는 것을 다염성적혈구로 하였다. Giemsa 염색한 표본에서 정염성적혈구는 핵이 없이 열린 붉은 색 혹은 갈색빛을 나타내는 적혈구를 정염성적혈구로 하였으며, acridine 염색한 표본에서의 정염성적혈구는 형광빛을 나타내지 않고 음영으로만 구분되는 것으로 하였다.

본 연구에서 소핵관찰 시 소핵의 판정은 크기(제일 큰 것은 적혈구 직경의 1/2 크기의 것으로, 제일 작은 것은 식별이 가능한 것까지), 형태(주로 원형이나 기타 도너츠형, 반원형 등의 형태의 것을 포함), 색깔(Acridine 염색 표본에서 근접한 유핵세포의 핵과 동일하게 녹색 형광빛을 띠는 것)을 기준으로 하였다.

결 과

1. 일반 증상 및 체중의 변화

화학물질 및 양성대조물질을 경구투여한 후 골수를 채취하기까지 실험동물에서는 특이한 임상증상은 관찰되지 않았다. 예비시험의 경우 12일간의 검역 및 순화를 행하고 건강한 30마리 마우스에 대해 군 구성을 수행하였을 때 이들의 체중범위는 37.45~42.97 g이었으며, 또한 본시험의 경우 11일

Table 1. Animal body weight of main micronucleus test with orally exposed to Al₂O₃

Time	Concentration	No. of animals	Average body weight (g)
24 hour	Negative control (1% CMC sol'n)	6	39.35 ± 1.77
	500 mg/kg b.w.	6	39.68 ± 1.53
	1,000 mg/kg b.w.	6	39.20 ± 2.14
	2,000 mg/kg b.w.	6	39.65 ± 1.69
	Positive control (MMC, 0.5 mg/kg b.w.)	6	39.37 ± 1.58

Table 2. Animal body weight of main micronucleus test with orally exposed to CaO

Time	Concentration	No. of animals	Average body weight (g)
24 hour	Negative control (Olive oil)	6	38.31 ± 1.87
	500 mg/kg b.w.	6	38.73 ± 1.74
	1,000 mg/kg b.w.	6	38.44 ± 1.42
	2,000 mg/kg b.w.	6	38.42 ± 1.63
	Positive control (MMC, 0.5 mg/kg b.w.)	6	38.33 ± 2.19

Table 3. Animal body weight of main micronucleus test with orally exposed to Na₂B₄O₇

Time	Concentration	No. of animals	Average body weight (g)
24 hour	Negative control (1% CMC sol'n)	6	39.41 ± 1.56
	500 mg/kg b.w.	6	39.26 ± 1.78
	1,000 mg/kg b.w.	6	39.40 ± 1.78
	2,000 mg/kg b.w.	6	39.43 ± 1.84
	Positive control (MMC, 0.5 mg/kg b.w.)	6	39.11 ± 1.97

간의 검역 및 순화를 하고 건강한 30마리 마우스에 대해 군 구성을 하였으며 이들의 체중범위는 35.35~42.01 g이었다. 이때 각 군의 평균체중은 Table 1, 2, 3과 같았다.

2. 소핵유발 빈도 및 세포독성

예비시험은 본시험에서의 최고투여농도를 결정하기 위한 한계시험으로써, 3가지 화학물질의 예비시험에서 모두 골수세포 증식 억제율을 관찰한 결

Table 4. The results of main micronucleus test with Al₂O₃ (for 24 hours)

Groups	Animal No.	PCE* observed	MNPCE** observed	MNPCE frequency (%)	(PCE+NCE***) counted	PCE counted	PCE/ (PCE+NCE)(%)
Negative control	1001	2036	4	0.20	508	270	53.15
	1002	2034	2	0.10	533	283	53.10
	1003	2024	1	0.05	542	162	29.89
	1004	2024	2	0.10	528	277	52.46
	1005	2019	3	0.15	503	230	45.73
	1006	2034	4	0.20	523	270	51.63
	Mean ± SD	—	—	0.13 ± 0.06	—	—	47.66 ± 9.14
500 mg/kg b.w.	1101	2046	5	0.24	537	252	46.93
	1102	2052	3	0.15	509	250	49.12
	1103	2034	0	0.00	509	280	55.01
	1104	2039	4	0.20	580	298	51.38
	1105	2041	4	0.20	511	262	51.27
	1106	2050	4	0.20	507	234	46.15
	Mean ± SD	—	—	0.16 ± 0.09	—	—	49.98 ± 3.28
1,000 mg/kg b.w.	1201	2107	2	0.09	522	232	44.44
	1202	2062	3	0.15	501	197	39.32
	1203	2049	3	0.15	552	109	19.75
	1204	2016	3	0.15	560	188	33.57
	1205	2039	5	0.25	519	224	43.16
	1206	2054	3	0.15	525	173	32.95
	Mean ± SD	—	—	0.15 ± 0.05	—	—	35.53 ± 9.07
2,000 mg/kg b.w.	1301	2060	1	0.05	505	162	32.08
	1302	2012	3	0.15	530	180	33.96
	1303	2055	2	0.10	530	85	16.04
	1304	2033	3	0.15	511	218	42.66
	1305	2046	2	0.10	516	264	51.16
	1306	2019	3	0.15	540	251	46.48
	Mean ± SD	—	—	0.11 ± 0.04	—	—	37.06 ± 12.61
Positive control MMC 0.5 mg/kg b.w.	1401	2043	20	0.98	509	271	53.24
	1402	2030	25	1.23	525	299	56.95
	1403	2038	34	1.67	504	257	50.99
	1404	2047	13	0.64	538	150	27.88
	1405	2067	7	0.34	508	234	46.06
	1406	2016	10	0.50	511	148	28.96
	Mean ± SD	—	—	0.89 ± 0.50	—	—	44.02 ± 12.59

*PCE, Polychromatic erythrocyte; **MNPCE, Micronucleated Polychromatic erythrocyte; ***NCE, Normochromatic erythrocyte

과 전 농도에서 소핵이 관찰되지 않았다.

예비시험결과를 토대로 하여 3가지 화학물질을 2,000 mg/kg b.w.을 투여 최고 농도로 공비 1/2의 3 단계 투여 농도군, 음성대조군, 양성대조군을 설정, 24시간을 투여기간으로 하여 본시험을 수행하였다. Aluminum oxide의 경우 동물개체별로 약 2,000개

의 다염성 적혈구에서 관찰한 소핵출현 적혈구의 빈도는 음성대조군에서 0.13 ± 0.06%, 500 mg/kg b.w. 투여군에서 0.16 ± 0.09%, 1,000 mg/kg b.w. 투여군에서 0.15 ± 0.05%, 2,000 mg/kg b.w. 투여군에서는 0.11 ± 0.04%로 관찰되어 음성대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 차이를 나타낸 투여군은

Table 5. The results of main micronucleus test with CaO (for 24 hours)

Groups	Animal No.	PCE* observed	MNPCE** observed	MNPCE frequency (%)	(PCE+NCE***) counted	PCE counted	PCE/ (PCE+NCE)(%)
Negative control	1001	2086	1	0.05	508	284	55.91
	1002	2044	3	0.15	567	338	59.61
	1003	2085	4	0.19	516	277	53.68
	1004	2008	4	0.20	522	291	55.75
	1005	2015	3	0.15	502	281	55.98
	1006	2199	1	0.05	514	274	53.31
	Mean ± SD	—	—	0.13 ± 0.07	—	—	55.71 ± 2.25
500 mg/kg b.w.	1101	2080	2	0.10	508	212	41.73
	1102	2008	3	0.15	506	265	52.37
	1103	2017	2	0.10	501	256	51.10
	1104	2045	6	0.29	520	266	51.15
	1105	2036	3	0.15	503	255	50.70
	1106	2121	4	0.19	508	182	35.83
	Mean ± SD	—	—	0.16 ± 0.07	—	—	47.15 ± 6.77
1,000 mg/kg b.w.	1201	2046	1	0.05	501	297	59.28
	1202	2012	3	0.15	511	267	52.25
	1203	2069	3	0.14	556	267	48.02
	1204	2068	1	0.05	559	306	54.74
	1205	2074	2	0.10	563	336	59.68
	1206	2045	5	0.24	517	283	54.74
	Mean ± SD	—	—	0.12 ± 0.05	—	—	54.79 ± 4.39
2,000 mg/kg b.w.	1301	2074	2	0.10	507	209	41.22
	1302	2220	2	0.09	522	280	53.64
	1303	2048	1	0.05	504	236	46.83
	1304	2001	2	0.10	523	289	55.26
	1305	2044	2	0.10	500	231	46.20
	1306	2104	2	0.10	544	184	33.82
	Mean ± SD	—	—	0.09 ± 0.02	—	—	46.16 ± 7.95
Positive control MMC 0.5 mg/kg b.w.	1401	2102	16	0.76	519	257	49.52
	1402	2038	18	0.88	506	293	57.91
	1403	2029	16	0.79	524	221	42.18
	1404	2039	18	0.88	567	293	51.68
	1405	2059	13	0.63	502	255	50.80
	1406	2017	18	0.89	550	208	37.82
	Mean ± SD	—	—	0.81 ± 0.10	—	—	48.31 ± 7.19

*PCE, Polychromatic erythrocyte; **MNPCE, Micronucleated Polychromatic erythrocyte; ***NCE, Normochromatic erythrocyte

관찰되지 않았다. 즉 본 화학물질에 의한 골수세포 다염성적혈구내 소핵 유발은 관찰되지 않았다. 또한 전체 적혈구 중 다염성적혈구의 비율을 관찰한 결과, 음성대조군에서 47.66 ± 9.14%, 500 mg/kg b.w. 투여군에서 49.98 ± 3.28%, 1,000 mg/kg b.w. 투여군에서 35.53 ± 9.07%, 2,000 mg/kg b.w. 투여군에서는

37.06 ± 12.61%로 관찰되어, 음성대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 차이를 나타낸 투여군은 관찰되지 않았다. 즉 본 화학물질에 의한 골수세포 적혈구 증식억제는 관찰되지 않았다 (Table 4).

Calcium oxide의 경우 소핵출현 빈도는 음성대조군에서 0.13 ± 0.07%, 500 mg/kg b.w. 투여군에서

Table 6. The results of main micronucleus test with Na₂B₄O₇ (for 24 hours)

Groups	Animal No.	PCE* observed	MNPCE** observed	MNPCE frequency (%)	(PCE+NCE***) counted	PCE counted	PCE/ (PCE+NCE)(%)
Negative control	1001	2050	2	0.10	522	276	52.87
	1002	2056	4	0.19	558	231	41.40
	1003	2116	3	0.14	530	188	35.47
	1004	2031	4	0.20	519	317	61.08
	1005	2064	4	0.19	506	156	30.83
	1006	2078	1	0.05	517	198	38.30
	Mean ± SD	—	—	0.15 ± 0.06	—	—	43.33 ± 11.43
500 mg/kg b.w.	1101	2062	3	0.15	509	149	29.27
	1102	2021	1	0.05	517	237	45.84
	1103	2016	3	0.15	516	179	34.69
	1104	2128	1	0.05	546	227	41.58
	1105	2055	3	0.15	566	218	38.52
	1106	2029	3	0.15	526	170	32.32
	Mean ± SD	—	—	0.11 ± 0.05	—	—	37.04 ± 6.14
1,000 mg/kg b.w.	1201	2022	1	0.05	516	280	54.26
	1202	2017	3	0.15	504	142	28.17
	1203	2045	4	0.20	510	158	30.98
	1204	2060	3	0.15	658	225	34.19
	1205	2010	5	0.25	513	150	29.24
	1206	2019	3	0.15	579	198	34.20
	Mean ± SD	—	—	0.16 ± 0.07	—	—	35.17 ± 9.68
2,000 mg/kg b.w.	1301	2055	7	0.34	542	187	34.50
	1302	2029	3	0.15	531	237	44.63
	1303	2038	4	0.20	607	172	28.34
	1304	2042	2	0.10	541	140	25.88
	1305	2047	4	0.20	615	209	33.98
	1306	2005	5	0.25	524	145	27.67
	Mean ± SD	—	—	0.20 ± 0.08	—	—	32.50 ± 6.90
positive control MMC 0.5 mg/kg b.w.	1401	2052	24	1.17	511	176	34.44
	1402	2050	14	0.68	578	195	33.74
	1403	2015	16	0.79	525	148	28.19
	1404	2329	18	0.77	508	278	54.72
	1405	2003	11	0.55	515	221	42.91
	1406	2059	23	1.12	512	221	43.16
	Mean ± SD	—	—	0.85 ± 0.25	—	—	39.53 ± 9.42

*PCE, Polychromatic erythrocyte; **MNPCE, Micronucleated Polychromatic erythrocyte; ***NCE, Normochromatic erythrocyte

0.16 ± 0.07%, 1,000 mg/kg b.w. 투여군에서 0.12 ± 0.05%, 2,000 mg/kg b.w. 투여군에서는 0.09 ± 0.02%로 관찰되어 음성대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 차이를 나타낸 투여군은 관찰되지 않았다. 또한 전체 적혈구 중 다염성적혈구의 비율을 관찰한 결과, 음성대조군에서 55.71 ± 2.25%, 500 mg/kg

b.w. 투여군에서 47.15 ± 6.77%, 1,000 mg/kg b.w. 투여군에서 54.79 ± 4.39%, 2,000 mg/kg b.w. 투여군에서는 46.16 ± 7.95%로 관찰되어, 음성대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 차이를 나타낸 투여군은 관찰되지 않았다 (Table 5).

Sodium tetraborate의 경우 소핵출현 적혈구의 빈

도는 음성대조군에서 $0.15 \pm 0.06\%$, 500 mg/kg b.w. 투여군에서 $0.11 \pm 0.05\%$, 1,000 mg/kg b.w. 투여군에서 $0.16 \pm 0.07\%$, 2,000 mg/kg b.w. 투여군에서는 $0.20 \pm 0.08\%$ 로 관찰되어 음성대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 차이를 나타낸 투여군은 관찰되지 않았다. 또한 전체 적혈구 중 다염성적혈구의 비율을 관찰한 결과, 음성대조군에서 $43.33 \pm 11.43\%$, 500 mg/kg b.w. 투여군에서 $37.04 \pm 6.14\%$, 1,000 mg/kg b.w. 투여군에서 $35.17 \pm 9.68\%$, 2,000 mg/kg b.w. 투여군에서는 $32.50 \pm 6.90\%$ 로 관찰되어, 음성대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 차이를 나타낸 투여군은 관찰되지 않았다 (Table 6).

따라서 본 3개 화학물질인 aluminum oxide, calcium oxide, sodium tetraborate는 마우스 골수세포를 이용하여 수행한 소핵유발연구결과, 화학물질의 투여군에 있어서 골수세포 다염성적혈구중 소핵을 갖는 적혈구의 출현빈도를 음성대조군과 비교하여 볼 때 통계적으로 유의하게 증가를 나타내는 투여군은 관찰되지 않았으며, 각 투여군에 있어 양-반응관계도 관찰되지 않았다. 따라서 본 화학물질은 당 소핵유발연구조건에서는 마우스 골수세포에 대해 소핵의 유발성이 없는 것으로 평가되었다.

고 찰

유전독성시험은 화학물질의 유전독성 및 발암원성을 예측하는데 그 목적이 있는 여러 가지 시험법을 말하며, 유전독성 혹은 발암원성을 예측하는 시험방법에는 미생물을 이용하는 유전자 돌연변이 시험, 포유류 배양세포를 이용하는 유전자 돌연변이 시험, 곤충류를 이용하는 유전자 돌연변이 시험, 마우스를 이용하는 스폿트 시험, 마우스를 이용하는 특정좌위 시험 등과 같이 유전자 돌연변이 유발성을 지표로 하는 시험이 있고, 포유류 배양세포를 이용하는 염색체 이상 시험, 설치류의 골수세포를 이용하는 염색체 이상 시험, 설치류를 이용하는 염색체 이상 시험, 설치류의 생식세포를 이용하는 염색체 이상 시험, 설치류를 이용하는 우성치사시험, 마우스를 이용하는 상호전좌시험, 식물세포를 이용하는 염색체 이상 시험 등과 같이 염색체 이상 유발성을 지표로 하는 시험이 있으며, 미생물을 이용하는 phage 유발시험, 미생물을 이용하는 DNA 수복시험,

포유류 세포를 이용하는 부정기 DNA 합성 (UDS) 시험, 포유류 세포를 이용하는 자매염색분체 교환 (SCE) 시험 등과 같이 DNA 손상성을 지표로 하는 시험과, 기타 효모를 이용하는 유사분열 승환 및 유전자 교환시험, 마우스를 이용하는 정자형태 이상 시험, 포유류 배양세포를 이용하는 형질전환시험 등이 있다 (국립환경과학원, 2007; 노동부, 2008).

대표적인 금속산화물인 aluminum oxide는 무취, 흰색에서 회색까지의 분말로 양쪽성산화물이며 산이나 알칼리화도 반응한다. 천연으로는 α -알루미나의 광물인 코런덤, 사파이어(백색) 및 수화물인 보크사이트 등의 형태로 산출되고, 공업적으로는 수산화알루미늄을 가열하여 생성한다. 알루미늄 금속의 제조, 연마제 (코런덤) 또는 알콜탈수용 촉매 등으로 사용된다 (화학경제연구원, 2004). 표적장기에 대한 주요 영향은 보고된 바 없고, 흡입노출로 인한 자극, 금속 흡 열, 호흡곤란, 피부 및 눈 접촉으로 인한 자극 등의 잠재적 영향이 있을 수 있으며, 발암성은 ACGIH-A4 (자료 불충분으로 인체 발암물질로 분류되지 않음)로 구분되어 있다. 알츠하이머병 (Alzheimer disease)은 신경독성물질 운반과정의 결함과 관련 있다고 알려져 있는데, 이것은 뇌 조직에서 알루미늄이 비정상적으로 많이 결합되고 마그네슘은 비정상적으로 적게 결합되는 것이 특징이다 (Glick, 1990). 유인원과 원숭이들에게 수화알루미늄 산화물을 뇌의 표면에 적용하거나 대뇌피질 또는 대수조에 주사하였을 때 변화, 진행성 뇌병증, 치매 및 경련, 신경섬유 변성이 관찰되었고, 이어서 중증 간질이 재발하였다 (Venugopal *et al.*, 1978). 알루미늄을 고양이의 뇌척수액에 직접 주사하였을 때 신경섬유 변성을 동반한 진행성 뇌병증이 발생했고 핵 내 알루미늄 함량이 증가하였다 (Crapper *et al.*, 1980). 암컷 rat에게 TD (독성용량) 2.0, 1.0, 0.5, 0.25 g/kg을 각각 투여했을 때 나타난 독성작용으로는 상대적 간 무게가 유의하게 감소한 것이었고 치사 작용은 없었다 (Kanoh *et al.*, 1982).

Calcium oxide는 석회로 금속칼슘을 산소 중에서 연소시키거나 탄산칼슘의 열분해로 생성되며, 생석회. 금속제련 시에 불순물을 슬래크로 제거하는데 사용된다 (화학경제연구원, 2004). 표적장기에 대한 주요 영향은 보고된 바 없고, 흡입노출, 피부 및 눈 접촉, 섭취 등으로 인한 화상의 잠재적 영향이 있

을 수 있으며, 발암성물질 목록에는 등재되어 있지 않고 유럽연합 규정인 EC 분류에는 부식성물질로 구분되어 있다. 산화칼슘은 대사활성화 여부와 관계없이 0.00125% 농도에서 시험하면 *S. cerevisiae* (균주 D4)의 유전자 돌연변이 및 유사재조합 분석과 *S. typhimurium* 균주 TA1535, TA1537 및 TA1538의 복귀돌연변이시험에서 음성반응으로 나타났다(Brusick, 1975)

Sodium tetraborate는 표적장기에 대한 주요 영향은 보고된 바 없고, 흡입노출로 인한 자극, 목소리 상실, 피부 및 눈 접촉으로 인한 자극, 눈 손상, 섭취로 인한 피부장애, 구토 등의 잠재적 영향이 있을 수 있으며, 발암성은 ACGIH-A4 (자료 불충분으로 인체 발암물질로 분류되지 않음)로 구분되어 있다. *S. typhimurium* 균주 TA98, TA100을 이용 0.01, 0.1, 1.0, 10.0, 100 µg/plate의 농도로 실시한 복귀돌연변이시험에서 음성을 나타냈으며(Benson *et al.*, 1984), V70 CHO 세포를 이용한 mammalian cell gene mutation assay에서도 음성을 나타냈다(Landolph, 1985).

하지만 이들 연구결과는 유전독성평가에 주로 이용되는 여러 시험들 중 한 가지를 수행한 것으로 소핵유발연구의 음성이라는 결과가 곧 그 화학물질의 유전독성(변이원성 및 발암성)이 전무하다고 선불리 판단하기에는 부족함이 있다. 실제 이들 화학물질을 취급하는 사업장 근로자들은 동 화학물질의 노출에 의해 호흡기계 이상, 피부 질환 및 알레르기 등의 위험이 증가될 수 있으며, 특히 sodium tetraborate의 경우 중추신경계 및 신장을 그 표적장기로 하고 있어(한국산업안전보건공단, 2007) 실제 작업장에서 동 물질의 취급 시에는 국소배기장치 등을 설치하는 등 환기를 철저히 하고, 근로자의 눈 보호를 위한 보안경 및 관련 사고를 대비한 세안설비와 비상세척설비(샤워식)의 설치가 반드시 필요하다. 또한 근로자는 적절한 내화학성 보호의 및 안전장갑을 착용하여야 하며, 사용빈도가 높거나 노출이 심한 경우에는 송기마스크, 공기호흡기 등의 호흡용 보호구를 착용하여 화학물질로 인한 사고 및 질병에 적극 대비해야 한다.

비록 이 화학물질들의 단회투여 유전독성이 없다고 할지라도 이 물질들이 해독과정을 거쳐 체외로 배출되는 과정에서 활성산소(Reactive Oxygen Species)를 방출하는 등 장기간 노출에 의한 염증

반응, 변이원성 및 유전독성, 발암성 등의 영향을 전혀 무시할 수는 없다. 따라서 본 연구기관을 비롯한 많은 연구 및 시험기관들에서 이들 화학물질에 대한 급성독성영향 뿐만 아니라 저농도 장기노출시의 근로자 건강영향 평가를 위한 만성흡입독성시험, 발암성시험 등의 추가연구 및 시험이 수행되어야 할 것이다.

결 론

본 연구의 화학물질인 aluminum oxide, calcium oxide, sodium tetraborate의 3개 화학물질은 마우스 골수세포를 이용하여 수행한 소핵유발연구결과, 화학물질의 투여군에 있어서 골수세포 다염성적혈구 중 소핵을 갖는 적혈구의 출현빈도를 음성대조군과 비교하여 볼 때 통계적으로 유의하게 증가를 나타내는 투여군은 관찰되지 않았으며, 각 투여군에 있어 양-반응관계도 관찰되지 않았다. 따라서 이들 화학물질은 당 소핵유발 연구조건에서는 마우스 골수세포에 대해 소핵의 유발성이 없는 것으로 평가되었다.

이들 화학물질은 마우스 골수세포를 이용한 소핵유발연구결과 해당 소핵유발연구조건에서는 마우스 골수세포에 대해 소핵의 유발성이 없는 것으로 평가되었다고 하여도, 이 연구결과는 유전독성평가에 주로 이용되는 여러 시험들 중 한 가지를 수행한 것으로 소핵유발 연구의 음성이라는 결과가 곧 그 화학물질의 유전독성(변이원성 및 발암성)이 전무하다고 선불리 판단하기에는 부족함이 있다. 실제 사업장에서는 동 화학물질의 노출에 의해 근로자의 호흡기계 이상, 피부 질환 및 알레르기 등의 위험이 증가될 수 있으며, 특히 sodium tetraborate의 경우 중추신경계 및 신장을 그 표적장기로 하고 있어 동 물질의 취급 시에는 국소배기장치 등을 설치하는 등 환기를 철저히 하고, 근로자의 눈 보호를 위한 보안경 및 관련 사고를 대비한 세안설비와 비상세척설비(샤워식)가 반드시 필요하다. 또한 근로자는 적절한 내화학성 보호의 및 안전장갑을 착용하여야 하며, 사용빈도가 높거나 노출이 심한 경우에는 송기마스크, 공기호흡기 등의 호흡용 보호구를 착용하여 화학물질로 인한 사고 및 질병에 적극 대비해야 한다.

또한 이들 화학물질에 대한 급성독성영향 뿐만 아니라 저농도 장기노출시의 근로자 건강영향 평가를 위한 만성흡입독성시험, 발암성시험 등이 추가로 수행되어야 할 것이다.

감사의 글

본 연구는 노동부 및 한국산업안전보건공단의 산업화학물질 관리지원 및 화학물질 유해성평가 사업의 일환으로 수행되었습니다.

참고 문헌

- 국립환경과학원. 고시 제2007-29호 화학물질유해성 시험 연구기관의 지정 등에 관한 규정. 2007.
- 노동부. 고시 제2008-11호 산업화학물질의 유해·위험성 시험 등에 관한 기준 별표6 제10항 유전독성시험. 2008.
- 노동부. 고시 제2008-26호 화학물질 및 물리적인자의 노출기준. 2008.
- 임경택, 김현욱, 김영교, 조해원, 마용석, 이권섭, 임철홍, 김현영, 양정선. 화학물질 유해성 평가를 위한 정보의 작성 및 활용. 한국환경독성학회지 2007; 22(1): 91-101.
- 한국산업안전보건공단. Aluminum oxide, calcium oxide, sodium tetraborate의 물질안전보건자료 (MSDS), 안전보건정보서비스(KOSHANET), 2007; <http://www.kosha.net/shdb/msds/main.jsp>.
- 화학경제연구원. ChemLocus 화학용어사전, 2004; <http://www.chemlocus.co.kr/>.
- 황호순. 물질안전보건자료제도 실무, 한빛미디어 2000.
- 日本 労働省 化学物質調査課. 安衛法 變異原性試験, 中央労働災害防止協會, 1991.
- 林 眞. 小核試験. -實驗法から データの 評價まで - 醫藥安全性研究會 monograph series No. 2. サイエンティスト社, 1991.
- Benson WH, Birge WJ and Dorough HW. Absence of mutagenic activity of sodium borate (BORAX) and boric acid in the Salmonella preincubation test, Environmental Toxicology and Chemistry 1984; 3(2): 209-214.
- Brusick D. Mutagenic evaluation of compound 001305788 calcium oxide (73-41). Kensington MD. USA: Litton Bionetics, Inc. (available from National Technical Information Service, Springfield VA, USA: rep no PB245-480) 1975.
- Crapper DR, Quittat S, Krishnan SS, Dalton AJ and De Boni U. Intranuclear aluminum content in Alzheimer's disease, dialysis encephalopathy, and experimental aluminum encephalopathy, Acta Neuropath 1980; 50: 19-24.
- Glick JL. Dementias: the role of magnesium deficiency and an hypothesis concerning the pathogenesis of Alzheimer's disease, Med Hypothesis 1990; 31(3): 211-215.
- Kanoh S, Ema M and Kawasaki H. Studies on the toxicity of insecticides and food additives in the pregnant rats. 2 Fetal toxicity of Alum, Oyo Yakuri 1982; 24(1): 65-69.
- Landolph JR. Cytotoxicity and negligible genotoxicity of borax and borax ores to cultured mammalian cells, Am J Ind Med 1985; 7: 31-43.
- National Institute of Occupational Safety & Health (NIOSH). Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS), 1998.
- National Research Council. Drinking water & Health Volume 4. Washington DC, 1981; pp. 156-165.
- Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals; Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test (TG 474), 1997.
- Schmid W. The Micronucleus Test, Mutat Res 1975; 31: 9-15.
- Venugopal B and Luckey Thomas D. Metal toxicity in mammals New York : Plenum Press, Becker Medical Library, Washington University in Saint Louis, Missouri; 1978. p. 111.