

Toluene과 Xylene 노출 근로자의 림포사이트에서 Cytochrome P-450(CYP)2B1/2의 발현

김기웅

한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원

Expression of cytochrome P-450(CYP)2B1/2 in lymphocytes of workers exposed to toluene and xylene

Ki-Woong Kim

*Occupational Safety and Health Research Institute, KOSHA
104-8, Munji-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-380, Korea*

In order to develop the methods for exposure assessment and find susceptibility markers for the workers who are exposed to low doses of toluene, xylene and other chemical in petroleum industries, we investigated the application of P-450 expression in human lymphocytes utilizing mouse monoclonal anti-rat CYP2B1/2, the levels of toluene and xylene in air and their metabolite levels in urine with the levels of expressed CYP2B1/2 proteins. The general characteristics such as age, smoking and drinking habit were no significant difference between the control and exposed workers, but the working durations and working hours were significantly different. Workers in exposed group were exposed to the mean of 2.1 ppm (range, 0.00-4.54) of toluene and 0.3 ppm (rang, 0.00-1.23) of xylene. The mean concentration of urinary hippuric acid was low and less than 1/5 of the biological exposure index recommended by the Ministry of Employment and Labor

Korea. Methyl hippuric acid in urine was not detected in control and exposed workers. Also, there were no significant differences in the levels of the urinary metabolites between the control and exposed group. When chemiluminescence dot blottings were carried out utilizing mouse monoclonal antibody against CYP2B1/2, the strong density dots corresponding to a mouse monoclonal antibody was observed in the human lymphocytes from the exposed workers.

These results suggested that the chemiluminescence dot blot assay for CYP of lymphocytes should be valuable for identifying CYP expression as biomarkers in the workers exposed to toluene and xylene.

Key Words: Toluene, Xylene, Human lymphocytes, CYP2B1/2, Metabolites

접수일: 2011년 2월25일, 채택일: 2011년 3월 17일

✉ 교신저자: 김기웅 (305-380) 대전광역시 유성구 엑스포로 339번 길 30(문지동 104-8)

Tel: 042)869-0303, Fax: 042)863-8361, e-mail: k0810@kosha.net

I. 서론

유해화학물질 노출 근로자의 건강보호를 위해서는 정확한 노출수준의 평가가 선행되어야 하고 노출물질에 대한 표적기관(target organ)과 대사기전을 근거로 한 생물학적 모니터링이 이루어져야 한다(Lauwerys와 Hoet, 1993).

현재 산업보건 분야에서 주로 사용되고 있는 생물학적 모니터링 방법은 근로자의 혈액과 소변에서 흡수된 물질과 대사산물의 배설량을 측정하여 평가하는 방법이다(고용노동부, 2009). 그러나 이러한 방법은 노출되는 물질의 독성 및 표적기관, 반감기(half life), 물리·화학적인 성질 등을 이해하고 있어야 하며, 시료 채취시 많은 주의가 요구된다. 또한 개인간 민감도에 따른 대사능력의 차이, 저 농도 노출에 대한 검출한계와 흡수된 물질 이외의 요인들, 즉 식습관과 환경오염 등에 의한 영향으로 과소 및 과대평가 될 수 있는 제한점을 가지고 있다. 따라서 이러한 제한점을 보완하고 특이성이 높은 생물학적 지표물질을 개발하려는 시도가 국내·외의 연구자들에 의하여 이루어지고 있다(LoPachin 등, 2003; Stierum 등, 2005; 김기웅 등, 2007). 이 연구 또한 toluene과 xylene의 대사에 관여하는 효소인 cytochrome P-450(CYP) 단일세포성 면역항체를 이용하여 선택성과 특이성이 큰 생물학적 모니터링 방법을 찾기 위한 목적으로 수행하였다.

생물학적 모니터링 방법은 자연과학분야와 분석기기의 발전으로 다양한 방법이 제시되고 있으며(Kataoka와 Saito, 2011; Razavi 등, 2011), 이들 분야의 발전은 이물질의 대사와 독성발현에 대한 기전을 이해하는데 결정적인 역할을 하고 있다. 그러나 생물학적 모니터링에 이용되는 생물학적 지표물질이 아무리 선택성과 특이성이 높다고 하더라도 중복성을 가지고 있으면 좋은 지표물질이라 할 수 없다.

생물학적 모니터링에서 선택성은 대상 근로자의 생물학적 매체(혈액, 소변 등)에서 변하지 않은 상태의 노출물질 또는 노출물질의 대사산물을 직접 측정하여 평가할 수 있음의 정도를 나타내는 것인데, 선택성이 크다 하여 특이성이 높은 것은 아니다(Lauwerys와 Hoet, 1993). 즉 toluene 노출 근로자에 대한 생물학적 모니터링은 toluene의 대사산물인 마노산의 배설량을 측정하여 평가하지만(선택성) 마노산의 농도는 toluene 노출뿐만 아니라 생활습관에 따라서도 농도의 변화를 보이므로 특이성이 높다고 보기는 어렵다.

산업체에서 널리 사용되는 단일벤젠고리 방향족탄화수소(monocyclic aromatic hydrocarbons, MAHs)계 물질 중 톨루엔과 크실렌은 이물질 대사효소인 cytochrome P-450(CYP)의 촉매 작용을 시작으로 일련의 대사과정을 거쳐 glycine이나 glucuronic acid와 결합하여 마노산과(Cohr와 Stokholm, 1979) 메틸마노산(Ogata 등, 1977) 등으로 배설된다. 따라서 toluene

과 xylene에 대한 생물학적 모니터링은 소변 중 마노산이나 메틸마노산 배설량을 측정하여 평가하고 있다(노동부, 2009). 그러나 마노산은 toluene 노출과 무관하게 음식물이나 청량음료 섭취뿐만 아니라 기타 방향족탄화수소계 물질의 노출에 의해서도 농도변화를 보일 수 있다(배기택 등, 1991). 제조업 근로자들이 취급하는 MAHs계 물질뿐만 아니라 기타의 유기용제는 단일물질보다 혼합물질 형태로 취급되기 때문에 대부분의 근로자들이 혼합물질에 노출되고 있다. 위에서 언급한 제한점을 감안하면 마노산과 메틸마노산이 toluene과 xylene 노출에 대한 생물학적 지표물질로 적합하다고 볼 수는 있지만 기타의 요인에 의한 영향으로 특이성이 매우 높다고 보기는 어렵다.

따라서 이 연구는 toluene과 xylene의 노출에 의하여 선택적인 유도(induction)를 보이는 CYP2B1/2 동위효소(김기웅과 허경화, 2009)에 대한 단일세포성 면역항체를 이용하여 유도된 정도를 정량화하여 toluene과 xylene 노출에 대한 생물학적 지표물질로서의 활용 가능성을 평가하고자 연구를 시도하였다.

II. 연구대상 및 방법

1. 연구대상

연구대상자 중 노출군은 석유화학산업체에서 주로 저 농도의 toluene과 xylene에 만성적으로 노출되는 남성 근로자를, 대조군은 toluene과 xylene뿐만 아니라 기타의 유해화학물질에도 노출되지 않는 남성 사무직 근로자를 선정하였다. CYP2B1/2의 동위효소의 유도 정도는 노출물질 이외에도 질병과 습관적인 약물복용 등의 영향을 받을 수 있으므로 설문 조사와 직접면접을 통하여 문제가 대조군 중 있는 대상자는 제외시켜 225명의 노출군과 82명의 대조군을 선정, 총 307명을 최종 대상자로 연구를 진행하였다. 이 연구는 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원의 생명윤리심의위원회 심의를 거쳐 승인 받은 후, 대상 사업장을 방문하여 근로자에게 연구목적, 방법 및 기타 제반사항 등을 자세히 설명하고 연구에 자발적으로 참여를 희망한 근로자를 대상으로 하였다.

2. 연구방법

1) 공기 중 toluene과 xylene 농도 및 대사산물 분석

toluene과 xylene의 공기 중 농도는 미국국립산업안전보건연구소(National Institute for Occupational Safety and Health, NIOSH)에서 추천하는 공정시험법(NIOSH, 1996)에 따라 작

Table 1. General characteristics of subjects

Variables	Exposed workers(n=225)	Control(n=82)
Age(yrs)	35.6±7.1	35.0±7.6
Smoking habit		
Non-smokers, n(%)	72(32.0)	23(28.0)
Smokers, n(%)	23(28.0)	59(72.0)
Drinking habit	54(23.6)	
Non-drinkers, n(%)		14(17.1)
Drinkers, n(%)	172(76.4)	68(82.9)
Working duration(yrs)	9.9±6.6**	5.3±5.3
Working hours	8.3±0.3**	9.5±1.7

**p<0.01.

Table 2. Concentration of ambient toluene and xylene and its urinary metabolites in subjects

Variables	Exposed workers(n=225)	Control(n=82)
Toluene		
Ambient toluene(ppm)	2.1(0.00-4.54)	-
Urinary HA(g/g Cr)	0.22±0.31	0.24±0.26
Xylene		
Ambient xylene(ppm)	0.3(0.00-1.23)	-
Urinary mHA(g/g Cr)	Not detected	Not detected

Values represents mean±S.D.

Values in parentheses indicate measurement ranges.

HA, hippuric acid; mHA, methyl hippuric acid; g/g Cr, g/g creatinine.

업자의 호흡기 위치에 활성탄을 흡착물질로한 개인시료 포집기(Personal air sampler, Gillian, USA)를 부착하여 채취하였다. 포집유량을 0.2 ml/min으로 8 시간 동안 포집한 후 활성탄관을 밀봉된 상태로 냉장 운반하였다. 흡착제에 이황화탄소(CS₂) 1 ml를 첨가하여 탈착시켜 가스크로마토그래피(CP-3899 GC/FID, Varian Ltd., USA)로 분석하였다. 대사산물 분석을 위한 대상자의 소변은 작업종료 30분 전에 채취하여 냉동 상태로 실험실로 운반하였다. 톨루엔과 크실렌의 대사산물인 마뇨산과 메틸마뇨산의 농도는 가스크로마토그래피(CP-3800 GC/FID, Varian Ltd., USA)를 이용하여 Carvalho 등(1991)의 방법에 따라 분석한 후, creatinine으로 보정하여 배설량을 산출하였다.

2) 혈액 lymphocytes 분리

혈액 lymphocytes는 Ficoll-Paque 사의 lymphocyte 분리용 kit(Ficoll-Paque, USA)을 이용하여 kit 제조사에서 제안한 방법에 따라 분리하였다. 전혈 2 cc를 취하여 생리식염수(0.9% NaCl) 2 ml와 혼합한 후, lymphocyte 분리용 시약 3 ml를 첨가

하고 원심분리(2,000 rpm에서 30분 동안)하여 lymphocyte층을 분리하였다. 분리된 lymphocyte 층에서 lymphocyte 이외의 혈액성분을 제거시키기 위하여 생리식염수를 첨가하여 원심분리(1,000 rpm) 하고 homogenizer를 이용하여 파괴시킨 다음, 단백질 정량과 면역항체 반응에 이용하였다.

3) 면역항체 분석

Dot blot kit에 Millipore 사(Bedford, MA, USA)의 Immobilon-P nitrocellulose membrane을 장착한 다음, 분리된 lymphocyte를 dot blot kit에 loading(6 µg) 한 후 4°C에서 24 시간 동안 정치시켜 Immobilon-P nitrocellulose membrane에 단백질을 결합시켰다. 면역항체 분석은 TROPIX 사(Bedford, MA, USA)의 Western Light-Plus™ kit을 이용하여 제조사에서 제안한 방법에 따라 실시하였다. Immobilon-P nitrocellulose membrane에 단백질이 결합되지 않은 부분을 blocking buffer를 사용하여 blocking 시킨 후, PBS buffer로 씻어내고 CYP2B1/2 동위효소에 대한 단일세포성 면역항체를 blocking buffer에 희석시켜 실온에서 2 시간 동안 반응시킨 다음, washing buffer로 세척

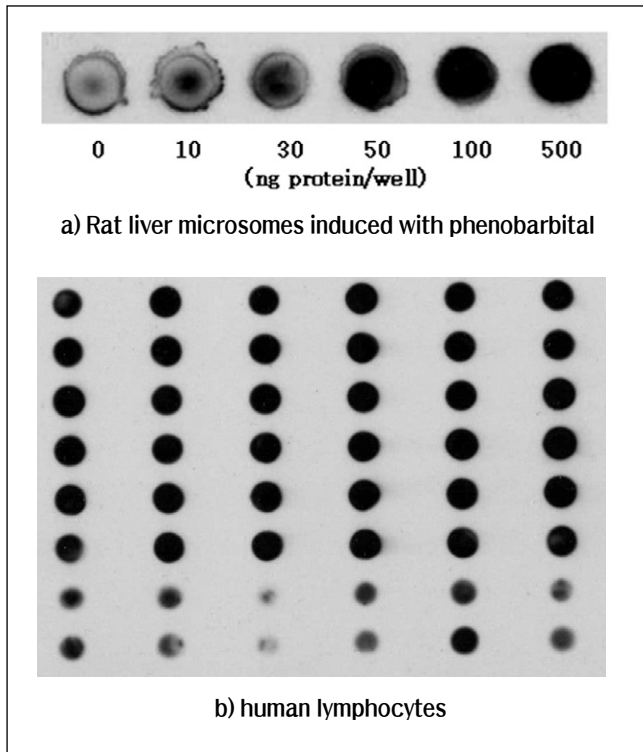


Fig. 1. Dot immunoblot assay for rat liver microsomes induced with phenobarbital and human lymphocytes utilizing mouse monoclonal anti-rat CYP2B1/2 antibody.

하였다. 2차 면역항체반응은 alkaline phosphatase가 conjugation 된 goat anti-mouse antibody를 blocking buffer에 희석한 다음, 실온에서 1 시간 동안 반응시키고 washing buffer를 이용하여 세척한 후 chemiluminescent 기질과 반응시킨 다음, x-ray film에 노출시켜 나타난 흑색반점의 강도를 Densitometer (Hitach, Japan)를 이용하여 측정하고 표준검량곡선에 의하여 CYP2B1/2 동위효소의 함량을 산출하였다(Fig. 1).

4) 자료분석

연구결과에 대한 자료는 Version 12.01 SPSS 통계 프로그램 (SPSS Inc., USA)을 이용하여 분석하였다. 실험자료에 대한 정규성 검정은 Kolmogrov-Smirnov test를, 노출군과 대조군간의 비교는 t-test, 1 요인분석 등을 실시하여 평균과 표준편차로 나타내었다.

III. 연구결과

노출군과 대조군 대상자의 평균연령은 35.6세와 35.0세로 두 군간 차이는 없었다. 노출군과 대조군 대상자 중 흡연자는 68.0%(153명)와 72.0%(59명), 음주자는 각각 76.4%(172명)

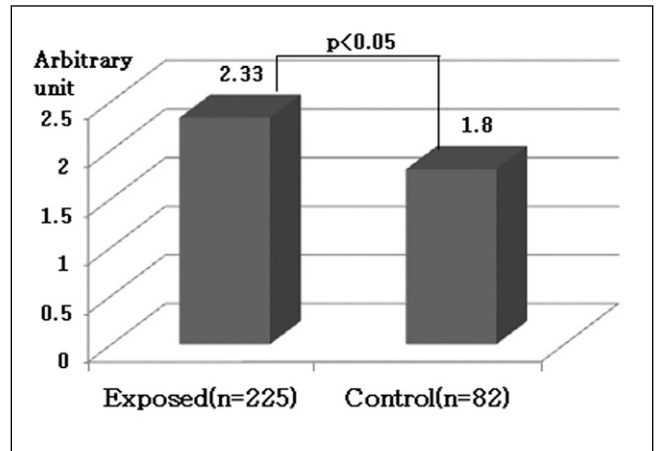


Fig. 2. Levels of CYP2B1/2 isozyme in lymphocytes of human exposed with toluene and xylene by dot immunoblot assay.

와 82.9%(68명)로 나타났으나 두 군간 통계적으로 유의한 차이를 보이지는 않았다. 두 군간 평균 근무경력(노출군에서 많은 9.9 ± 6.6 년 vs 5.3 ± 5.3 년, $p < 0.01$) 반면, 1일 근무시간은 대조군에서 많았다(8.3 ± 0.3 vs 9.5 ± 1.7 , $p < 0.01$). 노출군 대상자들이 노출되는 유기용제를 포집하여 분석한 결과 매우 미량의 물질도 검출되었으나 주로 toluene과 xylene에 노출되고 있었다. Toluene의 평균 노출농도는 2.1 ppm(범위: 0.00-4.54)이었고 이들 대상자에 있어서 toluene의 대사산물인 마노산의 배설량은 0.22 ± 0.31 g/g creatinine으로 측정되었다. Xylene의 평균 노출농도는 0.3 ppm(범위: 0.00-1.23)이었고 대사산물인 메틸마노산의 배설량은 검출되지 않았다. 대조군 대상자의 경우, 소변 중 마노산의 평균농도는 0.24 ± 0.26 g/g creatinine으로 측정되어 노출군 보다 다소 많은 배설량을 보였으나 두 군간 유의한 차이는 없었고 메틸마노산은 검출되지 않았다.

CYP2B1/2 동위효소에 선택적 특이성을 보이는 phenobarbital을 투여한 흰쥐의 microsomes을 표준물질로 하여 (Fig. 1) 연구대상자의 혈중 lymphocyte에서 유도된 CYP2B1/2 동위효소의 양을 화학발광분석(Chemiluminescence)에 의한 Dot blot를 실시한 결과, 대조군의 1.80 ng(Arbitrary unit)보다 노출군에서(2.33 ng Arbitrary unit) 유의한 증가를 보였다($p < 0.05$)(Fig. 2).

IV. 고찰

이 연구는 저 농도의 toluene과 xylene에 만성적으로 노출되는 근로자에 대한 생물학적 모니터링을 실시하는데 있어서

특이성과 선택성을 가지는 지표물질을 찾고, 활용 가능성을 파악하기 위한 목적으로 CYP2B1/2 단일세포성 면역항체를 이용하여 진행하였다. 그 결과, 노출군과 대조군 대상자의 소변에서 toluene과 xylene의 대사산물인 마노산과 메틸마노산의 배설량은 두 군간 차이를 보이지 않았으나 대조군보다 노출군 대상자의 혈액 lymphocytes에서 CYP2B1/2 동위효소의 유도가 유의하게 많았다. Toluene과 xylene뿐만 아니라 MAHs계 물질은 비슷한 대사경로를 거쳐 체외로 배설된다. 이들 물질의 대사에 있어서 CYP는 대사과정의 맨 처음 단계에 관여하여 benzene 고리에 붙어 있는 methyl기를 수산화반응(hydroxylation)을 통해 수용성물질로 대사변형 시키는 과정에 관여하고(Arlie-Söberg, 2000), 이 과정이 전반적인 대사 속도를 결정하는 단계이다. Lu와 Cederbaum(2008)은 MAHs계 물질과 같은 저분자량 물질의 대사에 CYP2E1/2 동위효소가 관여한다고 하였으며, Foy와 Schatz(2004)는 CYP2B1/2 동위효소도 선택적인 활성을 보인다고 하였다. 김기웅과 허경화(2009)는 toluene과 xylene에 노출시킨 흰쥐의 microsomes에서 CYP2B1/2와 CYP2E1/2 동위효소의 유도를 확인하였으며, toluene과 xylene 단일보다 혼합노출에 의한 CYP2B1/2 동위효소의 유도가 현저함을 보고하였다. 또한 CYP는 유해화학물질뿐만 아니라 흡연(DeMarini, 2004), 음주(Elovaara 등, 2007) 및 카페인(Chung 등, 1998) 등의 대사에도 관여하는 것으로 알려져 있으며, 외인성물질(exogenous substances)뿐만 아니라 내인성물질(endogenous substances)인 지방산, 스테로이드 및 prostaglandine 등의 대사에도 관여한다(Omura 등, 1993). CYP는 간장, 폐, 신장, 뇌, 태반 및 혈액 등 체내의 전반적인 기관에 널리 분포하고 있으며, 위에서 언급한 외인성물질, 성별 및 인종 등의 영향으로 CYP 발현과 유도에 많은 차이를 보이고 있어 사람, 미생물, 동물 및 식물 등에서 현재까지 밝혀진 superfamily의 종류만도 수백종에 이른다(Nelson 등, 2004). 따라서 이 연구에서는 저농도 toluene과 xylene에 만성적으로 노출되는 근로자와 이들 물질 뿐만 아니라 기타의 화학물질에 노출되지 않는 대조군 대상자를 선정하여 혈액 lymphocytes에서 CYP2B1/2 동위효소의 유도를 측정하여 결과 대조군 근로자에서 보다 노출군 근로자에서 CYP2B1/2 동위효소의 유도가 통계적으로 유의하게 증가됨을 확인하였다. 두 군간 CYP 발현과 유도에 영향을 줄 수 있는 흡연, 음주 및 습관성 약물복용 등의 차이가 없는 상황에서 이러한 결과를 보인 것은 toluene과 xylene의 노출로 인하여 CYP2B1/2 동위효소가 유도된 것으로 판단된다. 또한, 저농도의 toluene과 xylene에 만성적으로 노출된 근로자들의 노출 대사산물인 마노산과 메틸마노산의 배설량이 대조군과 차이를 보이지 않는 상태에서 CYP2B1/2 동위효소의 유도가 차이를 보인 것은 단일세포성 면역항체를 이용한 방법이 선택성과 특이성이

높은 생물학적 지표물질로의 활용 가능성이 있음을 보여준 결과라 생각된다. 그러나 금번 연구의 결과를 가지고 toluene과 xylene의 노출에 대한 생물학적 지표로 활용하기 위해서는 노출수준 변화에 따른 CYP 동위효소의 유도량 변화와 유전적인 영향에 대한 평가가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

V. 결론

이 연구는 CYP2B1/2 단일세포성 면역항체를 이용하여 toluene과 xylene 노출 근로자의 혈액 lymphocytes에서 CYP2B1/2 동위효소의 발현 정도를 측정하여 노출을 평가할 수 있는 새로운 생물학적 지표물질을 개발하고 활용 가능성을 평가하고자 하였다. 그 결과, 대조군 대상자보다 노출군 대상자에서 CYP2B1/2 동위효소의 유도가 통계적으로 유의하게 증가됨을 확인하였다. 노출군과 대조군 대상자에서 CYP2B1/2 동위효소의 발현에 영향을 줄 수 있는 흡연, 음주 및 습관성 약물복용 등의 차이가 없는 상황에서 노출 근로자에서 CYP2B1/2 동위효소의 발현 증가는 toluene과 xylene 노출에 의한 결과라 판단된다. 이러한 결과는 수 백종에 이르는 CYP superfamily의 기질 특이성을 이용하여 다양한 종류의 유기용제에 노출되는 근로자의 노출 평가에 대한 생물학적 지표물질로서의 활용 가능성을 보인 것으로 생각된다.

REFERENCES

- 고용노동부. 산업안전보건법령집. 2009
- 김기웅, 허경화, 원용립, 정진욱, 김태균, 박인정. Styrene 노출에 반응을 보이는 혈청 단백질에 대한 프로테오믹스 분석. 한국산업위생학회지 2007;17(3):235-244
- 김기웅, 허경화. Xylene에 의한 CYP2B1/2의 유도와 대사에 있어서 toluene의 영향. 한국산업위생학회지 2009;19(1):73-79
- 배기택, 문덕환, 김종한, 문찬석, 이채연. 톨루엔 크실렌 및 벤젠폭로의 생화학적지표들에 관한 연구. 대한산업의학회지 1991;3(2):165-176
- Arlie-Söberg P. Solvent neurotoxicity. CRC Press Inc., Florida, 1992, 107-124
- Carvalho D, Lanchote VL, Bonato PS, Queiroz R, Santos AC, and Dreossi S. A new derivatization procedure for the analysis of hippuric acid and methyl hippuric acid by gaschromatography. Int Arch Occup Environ Health 1991;63:33-37
- Chung W-G, Roh H-K, Kim H-M, Cha Y-N. Involvement of

- CYP3A1, 2B1, and 2E1 in C-8 hydroxylation and CYP1A2 and flavin-containing monooxygenase in N-demethylation of caffeine: identified by using inducer treated rat liver microsomes that are characterized with testosterone metabolic patterns. *Chemico-Biological Interactions* 1998;113:1-14
- Cohr KH, Stokholm J. Toluene. a toxicology review. *Scand J Work Environ Health* 1979;5:71-90
- DeMarini DM. Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. *Mutation Res* 2004;567:447-474
- Elovaara E, Stockmann-Juvala H, Mikkola J, Gelboin HV. Interactive effects of methyl tertiary-butyl ether (MTBE) and tertiary-amyl methyl ether (TAME), ethanol and some drugs: Triglyceridemia, liver toxicity and induction of CYP (2E1, 2B1) and phase II enzymes in female Wistar rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 2007;23:64-72
- Foy JW, Schatz RA. Inhibition of rat respiratory-tract cytochrome P-450 activity after acute low-level m-xylene inhalation: role in 1-nitro-naphthalene toxicity. *Inhal Toxicol* 2004;16(3):125-132
- Kataoka H, Saito K. Recent advances in SPME techniques in biomedical analysis. *J Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2011;54:926-950
- Lauwerys RR, Hoet P. Industrial Chemical Exposure: Guidelines for Biological Monitoring. 2nd ed., Lewis Publishers, Florida, 1993, 1-13
- LoPachin RM, Jones RC, Patterson TA, Slikker WJr, Barber DS. Application of proteomics to the study of molecular mechanisms in neurotoxicology. *Neurotoxicology* 2003;24(6):761-775
- Lu Y, Cederbaum AI. CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol. *Free Radical Biology & Medicine* 2008;44:723-738
- Nelson DR, Zeldin DC, Hoffman SM, Maltais LJ, Wain HM, Nebert DW. Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics* 2004;14(1):1-18
- NIOSH. NIOSH manual of analytical methods, 4th ed., Method 1051, U.S. Department of Health and Human Services, Cincinnati 1996
- Ogata M, Sugihara R, Kira S. Quantitative determination of urinary HA and m- or p-xylene exposure by HPLC. *Int Arch Occup Environ Health* 1977;39:199-206
- Omura T, Ishimura Y, Fujii-Kuriyama Y. Cytochrome P-450. 2nd ed., Kodansha Ltd, Tokyo, 1993
- Razavi M, Pope ME, Soste MV, Eyford BA, Jackson AM, Anderson NL, Pearson TW. MALDI immunoscreening (MiSCREEN): A method for selection of anti-peptide monoclonal antibodies for use in immunoproteomics. *J Immunological Methods* 2011;364:50-64
- Stierum R, Heijne W, Kienhuis A, Ommen BV, Groten J. Toxicogenomics concepts and applications to study hepatic effects of food additives and chemicals. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;207:S179-S188