

디젤분진(PM2.5)에 함유된 발암성 및 내분비계 장애물질의 독성영향 평가

정규혁

성균관대학교 약학부

Toxicological Evaluation of Carcinogenic and Endocrine Disrupting Chemicals in Diesel Exhaust Respirable Particulate Matter

Kyu-Hyuck Chung

College of pharmacy, Sungkyunkwan university,
Chunchun-dong 300, Changan-gu, Suwon, Kyonggido 440-746, Korea

1. 서 론

공기, 물, 토양 및 식품에 존재하는 환경중의 혼합물질 (Environmental complex mixture)에는 수 없이 많은 화학물질이 존재하며 이의 발암성 등 건강영향에 관심이 기울여지고 있다. 미세먼지 (PM2.5)는 거의 전부가 인간 활동의 결과 발생하는 분진이라고 할 수 있으며 호흡기 깊숙한 곳까지 흡입되고 침착되기 때문에 호흡성 분진(PM10)보다도 건강에 미치는 영향을 평가할 수 있는 기준으로서 더 적합하다고 알려져 있다. 도시대기환경 중의 미세먼지는 자동차 배기가스 특히 디젤자동차가 주요 배출원으로서 배출되는 물질에는 가스상물질 (Ethylbenzene, styrene, toluene 등)과 입자상 물질이 있다. 이 중 입자상 물질 (Particulate Matter)과 NO_x 등은 대기 환경을 크게 악화시키고 있으며 전체 대기 중 이들 물질의 존재량의 85 %와 67 %를 각각 차지할 정도라고 보고되어 있다 (국립환경연구원, 1998). 디젤분진의 입자 크기는 대부분 1 μ m 이하로 알려져 있으며, 이들 입자는 크기에 비해 넓은 비표면적을 가지고 있어 발암성, 돌연변이원성을 가진 물질이 쉽게 흡착되는 것으로 알려져 있다 (Rickeard 등, 1996). 대기분진은 대표적인 환경 혼합물질로서 다양한 화학물질을 함유하고 있다. 그간 디젤분진에 대한 많은 연구를 진행한 미국 EPA에서는 PAH(polycyclic aromatic hydrocarbons)가 주요 성분이며 특히 주된 발암변이원성 물질로서 benzo(a)pyrene, benzo(a)anthracene, chrysene, benzo(b)fluoranthene, benzo(k)fluoranthene, dibenz(a,h)anthracene, 및 indeno[1,2,3-cd]pyrene 등 7가지 성분을 Group B2(probable human carcinogens)로 분류하여 집중 연구하고 있으며 규제를 강화하고 있다. 그러나 미세먼지 등 환경중에 혼합물질로서 존재하는 모든 화학물질을 분석화학적 방법에 의해 검출하는 것은 거의 불가능하다. 따라서 최근에는 Bioassay-Directed Chemical Analysis에 의해 발암성 등 건강장애를 유발하는 주요 원인물질을 찾아내는 방법이 효과적이라고 보고 있다. 이 방법은 소량의 환경시료 중에 존재하는 물질을 민감하게 검출할 수 있는 bioassay를 이용하여 독성작용을 나타내는 특정 분획을 파악하고 이 분획 중에 함유된 물질을 분석화학적 방법에 의해 분석하여 이중 bioassay에 의해 나타나는 강한 독성작용과 관련되는 물질을 확인함으로써 건강영향과 관계있는 우선적 물질을 찾아내는 방법이다. 따라서 이 방법은 규제관리 대상물질을 선정하고 위해성을 평가하는데 적합한 도구로서 활용되고 있다. 또한 기존의 분석화학적 방법에 의한

규제관리에 비해 실제 독성영향을 고려하여 우선적 순위에 의해 화학물질을 관리할 수 있게 되므로 국민건강개선 및 경제적 비용절감 등 사회적 효과가 보다 직접적이라고 나타날 수 있다. 이를 위해서는 적합한 bioassay의 선정과 활용은 이러한 접근법에 우선적으로 고려해야 하는 사항이다. 민감성, 간편성, 신속성, 정확성은 적합한 방법을 선정하는데 필요한 기본적 요건이다. 또한 이들 방법이 적극 활용되기 위해서는 무엇보다 실험실 또는 실험자간 오차를 줄이고 재현성이 부족한 문제점을 개선하는 것이 필요하다. 이 문제점만 개선된다면 정량성이 우수한 몇몇 bioassay는 분석화학적 환경기준의 단점을 보완할 수 있는 방안으로서도 활용성이 높아질 전망이다. 그러므로 이 방법은 활용하기 이전에 표준화하여 방법을 확립한 후 많은 시료를 대상으로 측정된 기초 자료를 축적함으로써 단점을 보완하고 있다. 본 연구에서는 미세먼지의 독성영향과 원인물질을 규명하기 위한 Bioassay-Directed Chemical Analysis를 확립하고 이를 이용하여 대기분진의 주요 발생원인 디젤분진에 대해 발암성 및 내분비계 장애 작용과 주요 원인물질을 규명함으로써 향후 국내 대기오염의 개선을 위한 우선순위 규제관리대상 물질과 그 규제수준을 결정하기 위한 기초 자료로서 활용하기 위한 목적으로 연구를 수행 중이다.

2. 연구방법

2.1 디젤분진의 포집 및 전처리

디젤엔진에서 처음 배출되는 입자는 nuclei mode로 그 크기가 $0.03 \mu\text{m}$ 이하로 탄소물질로 구성되어 있으며, 배기 시스템에서 온도에 따라 산화와 응집에 의해 특성이 크게 변하게 된다. 일부 입자는 배기관 벽에 열 영동력(thermophoretic force)에 의해 침착된다. 경유자동차 배출 입자상물질의 물리·화학적 특성은 엔진의 연소실에서 발생되어 자동차 밖으로 배출되면서 변화되며 탄소류는 불완전 연소 또는 윤활유 등의 흡착에 의해 증가하게 된다. 이들 디젤엔진에서의 입자 형성 및 침착 등은 배출되는 시점에서의 온도에 따라서 크게 달라지기 때문에 엔진의 사용연수, 연료형태, 운전조건, 후처리장치 등에 의해서 입자의 배출정도와 크기분포 특성에 큰 영향을 미치게 된다. 따라서 본 연구에서는 디젤연료를 사용하는 자동차의 배기구에 연결하여 운전시 발생하는 디젤분진을 포집하기 위해 미국 EPA에서 규정하고 있는 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 이하의 온도를 유지하는 상태에서 김 등 (1999)에 의해 고안된 dilution system에 따라 포집장치를 디자인하였다. 디젤분진 포집장치는 exhaust tunnel, dilution system 및 cascade impactor의 3부분으로 나누어 구성되어 있다. Exhaust tunnel은 자동차의 배기구에 바로 연결하였고 대기상태와 비슷한 온도 조건을 맞추어주기 위해 dilution system에서 HEPA filter를 통과한 공기에 의해 포집장치의 온도를 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 이하로 유지시켰다. Dilution system을 통과한 부분의 배출구에 cascade impactor를 연결하여 입자크기별로 포집되도록 장착하여 배출되는 디젤분진을 입자크기별(PM10이상, PM10-2.5, PM2.5)로 포집하였다.

2.2 디젤분진 시료의 전처리

디젤분진 중에 함유되어 있는 수용성물질은 일정량의 시료를 적당량의 PBS로 현탁시킨 후 sonication하여 추출하였다. 유용성물질은 Lewtas 등 (1990)의 방법을 수정한 방법에 의해 추출하였다. 디젤분진이 입자크기별(PM 10, PM 2.5-10.0 및 PM 2.5)로 흡착되어 있는 teflon filter의 무게를 달고 $1\text{cm} \times 1\text{cm}$ 크기로 자른 후, DCM에 현탁시켜 sonication하였다. DCM으로 추출된 crude extract (Sample 2)는 liquid-liquid extraction에 의해 산성(Sample 3)과 염기성 추출물(Sample 4)로 분리하고, silica column chromatography에 의해 극성(polarity)에 따라 hexane(Aliphatic compounds, Sample 5), DCM/hexane(1:1, Aromatic compounds, Sample 6), DCM(Slightly polar compounds, Sample 7),

DCM/MeOH(1:1, Moderately polar compounds, Sample 8) 및 MeOH(Highly polar compounds, Sample 9)로 각각 5개 분획으로 추출하였다. 각 분획된 시료는 GC-MS에 의한 기기분석과 bioassay를 위한 시료로 사용하였다.

2.3 EROD (Ethoxyresorufin-*O*-deethylase)-microbioassay

EROD-microbioassay는 CYP1A계열의 효소로서 ethoxyresorufin이 EROD에 의해 형광을 띄는 resorufin으로 대사되는 성질을 이용하여 다이옥신 유사물질을 측정하는 기법이다. 96 well-plate에 H4IIE (Rat hepatoma cell line) 세포가 80 % 되었을 때 미세분진 시료를 처리하여 48시간 배양한 후 5 μ M dicumarol 및 4 μ M ethoxyresorufin이 첨가하여 37 °C에서 30분간 배양한 다음 각 well의 배양액을 분리하여 형성된 resorufin의 형광을 fluorescence spectrophotometer로 excitation 530nm, emission 588nm에서 측정하였다. Bradford 방법에 의해 단백질을 정량하여 EROD 활성값을 보정하였다. 측정된 시료의 EROD 값을 TCDD(2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin)의 최고 활성 유도 농도인 10^{-9} M의 EROD값을 100 %으로 하여 비교하여 TIR을 구하고 TCDD의 용량-반응성과 비교한 상대적 농도인 TCDD equivalent concentration 즉, Bio-TEQs를 구하여 정량하였다.

2.4 Single cell gel electrophoresis (Comet assay)

Comet assay는 Singh 등(1991)의 방법을 변형하여 alkaline (pH 13) 조건에 의해 Human alveolar epithelial cell인 A549 세포를 이용하여 측정하였다. 6-well plate에 세포를 키운 후 시료를 DMEM에 적정 농도로 희석하여 각 well에 처리하였다. 24시간 정도 배양한 후 세포성장을 정지시키고 low-melting agarose에 현탁시킨 후 0.5 % normal agarose로 미리 코팅된(1 layer) fully frosted microscope slides에 도포하고(2 layer), agarose가 굳은 후 다시 low melting agarose로 도포한다(3 layer). 이 슬라이드는 lysing solution 에 1시간 정도 넣어 세포를 용해시키고 unwinding 과정을 거쳐 전기영동하였다. 전기영동 후에 슬라이드는 ethidium bromide image analysis system(Komet version 5, Kinetic Imaging Ltd.)을 이용하여 DNA 손상을 측정하였다.

2.5 in vitro micronucleus test

CHO 세포를 이용하여 *in vitro* MN을 측정하였다. 세포를 8-well chamber slide에 분주된 세포에 시료를 배양액에 희석하여 처리하였다. 시료처리시 대사에 따른 독성의 차이를 확인하기 위해 S9를 첨가한 후의 반응을 관찰하였고, 또한 cytokinesis를 block시킬 수 있는 cytochalasin B를 시료처리 시간과 동일시간 동안 처리하여 cyt-B가 처리되지 않는 것과 비교하였다. 24시간동안 시료 처리한 후 세포를 고정하였다. 슬라이드를 건조시킨 후 RNase(0.01 mg/ml in 2 \times SSC)로 37°C에서 3-7분간 배양하고 이 slide를 2 \times SSC와 증류수로 각각 세척하고 건조시킨 후 5% Giemsa로 15분간 염색한 후 MN을 관찰하였다. Micronucleus는 적어도 시료처리 농도당 각 2 well씩 실험하며 농도당 1,000개의 세포를 관찰하였다. MN은 upright microscope를 이용하여 emulsion oil을 처리한 후 1,000 \times magnification에서 관찰하였다. 계수된 MN의 양성 판정은 용량 반응성이 있고 음성대조군에 비해 3배 이상의 MN이 유도되며 염색후의 세포 밀도가 대조군에 비해 25 % 이하가 되지 않는 것으로 하였다.

2.6 E-screen assay

MCF7-BUS cell을 이용한 E-SCREEN assay는 Pilar Perez 등⁷⁾의 방법에 따라 실험하였다. 계대 중인 세포를 48-well plate에 각 well 당 세포수가 5,000cell이 되도록 분주한 후 37°C, 5% CO₂배양기에서 배양하여 바닥에 부착시켰다. 48시간 정도 세포를 부착시킨 후 배양액은 10 % CDFBS를 함유

한 phenol red가 없는 DMEM으로 교체시켜 시료를 처치하였다. 에스트로겐 활성을 확인하기 위한 실험에서는 시험물질을 단독투여하였고, 항에스트로겐 활성을 보기 위해서는 E_2 10^{-11} M과 병용투여하였다. 144시간동안 시험물질에 노출시킨 후 세포성장은 SRB방법에 의해 microplate reader (Molecular device)를 사용하여 490nm에서 흡광도를 측정하였다. 에스트로겐 효과를 정량적으로 평가는 양성대조군인 17 β -estradiol에 의해 최대 세포증식을 나타내는 최소 농도를 기준으로 하여 시험물질에 의해 최대 세포증식을 나타내는 최소 농도와의 상대 비교를 백분율 환산한 세포증식 효력 상대비(relative proliferative potency, RPP)와 17 β -estradiol에 의한 최대 세포증식상태의 세포수에 대한 시험물질에 의한 최대 세포증식상태의 세포수를 백분율로 환산한 세포증식 효과 상대비(relative proliferative effect, RPE)를 구하여 비교하였다.

3. 연구결과

3.1 디젤분진 중 미세먼지의 함량 및 PM2.5 추출물 중의 다이옥신 유사물질 함량측정

디젤분진시료를 입자크기별로 포집한 결과 PM10이 8.42%, PM2.5~10이 3.87%, PM2.5가 87.71%로서 PM2.5가 대부분을 차지함을 알 수 있었다. PM2.5시료를 시험방법에 의해 추출하여 이중에 함유되어 있는 다이옥신 유사물질을 EROD-microbioassay에 의해 측정된 결과 2, 5 및 6번 분획시료에서 활성이 높게 나타났으며 용량의존적인 증가가 확인되었다. 또한 CYP1A1 mRNA의 발현도 이와 유사한 결과를 보여 주었다. 따라서 디젤분진 중에 다이옥신 유사작용 물질이 함유되어 있으며 이들 시료 중에 함유된 다이옥신 유사물질의 함량은 TEQ량으로서 32.82~70.82 ng-TEQ/g-dry weight diesel PM2.5에 해당되는 것으로 나타났다.

3.2 디젤분진의 유전독성 평가

유전독성을 평가하는 방법은 매우 다양하나 그 중 시험목적에 따라 3종류 이상의 시험을 조합하여 시험하도록 권장하고 있다. 시험항목으로는 세균류를 이용한 시험으로 Ames test와 포유류 세포를 이용한 시험방법 중 HGPRT 또는 MOLY 방법 중에서 한가지 그리고 염색체이상시험 중 chromosome aberration 또는 MN(Micronucleus test)중에서 한가지를 선택하여 실험한다. 본 연구에서는 포유류 세포를 이용한 시험법으로 최근 연구되고 있는 Comet assay를 확립하여 적용하였으며 염색체이상 시험으로는 *in vitro* micronucleus test를 확립하여 적용하였다.

Comet assay - 디젤분진이 인간폐암세포인 A549세포에서의 DNA손상을 일으키는 지를 Comet assay로 관찰한 결과 각 분획시료의 처치 후 comet이 형성되는 것으로 나타났다. 각 시료에서 형성된 comet의 olive tail moment값을 빈도별로 나타낸 결과 olive tail moment 값이 0에서 30까지 다양한 분포를 나타냈으며 그 값들을 0~2, 2~4, 4~6, 6~9 및 9이상으로 구분하여 그 빈도 분포를 그래프로 나타냈다. 대조군의 경우에는 olive tail moment의 값이 0~2 사이에 빈도가 집중되어 있고, 디젤분진 시료의 경우 comet 형성이 많이 유도된 분획에서는 olive tail moment값이 높은 쪽으로 그 빈도가 증가하는 현상이 나타났다. 이 값들의 median 값을 각 시료별로 표시하였다. 그 결과 대부분의 분획시료 중에 DNA손상을 유발하는 물질이 존재하는 것으로 추정되었다.

***in vitro* Micronucleus test** - 디젤분진의 각 분획시료에 대해 aneugen 및 clastogen 효과를 관찰하기 위해 CHO cell에서 *in vitro* micronucleus test를 시험한 결과 모든 분획 시료에서 MN이 대조군에 비해 유의적인 증가가 유도되었다. 대조군에 비해 3배 이상 MN이 유도된 것은 양성으로 판정한

결과(Kreja and Seidel, 2002) 대부분의 분획시료가 양성판정으로 나타나 염색체 이상을 유발할 수 있는 물질이 함유된 것으로 추정되었다.

Ames test - Ames test에 의해서도 디젤분진(PM2.5) 시료에 의한 용량의존적인 반응성이 확인되어 유전독성을 확인할 수 있었다.

GC-MS 분석 - 유전독성을 유발하는 주요 원인물질을 추적하기 위해 유전독성이 강하게 나타나는 6번 분획시료에 대해 GC-MS의 SIM mode에 의해 성분을 분석한 결과 11.39 ppb의 1,2,5,6 dibenzanthracene, 5.09 ppb의 chrysene, 3.72 ppb의 1,2-benzanthracene, 1.25 ppb의 phenanthrene 및 1.40 ppb의 fluoranthene이 각각 검출되었다.

3.3 디젤분진의 내분비계 장애작용 평가

E-screen assay에 의해 디젤분진(PM2.5)의 내분비계 장애작용을 평가한 결과 대부분의 시료에서 에스트로젠 작용성이 나타났으며 EROD 활성이 높게 나타난 분획시료에서는 작용성이 약하게 나타났다. 이는 다이옥신 유사물질의 항에스트로젠 작용과 관련이 있을 것으로 추정되었다. 정량적으로 농도를 측정된 결과 1.0~610.8 pg/g EEQ 농도로 나타났다. 한편 crude extract에서는 16.3 ng/g EEQ의 높은 농도가 측정되어 각 분획 중에 존재하는 성분의 상승작용에 의한 효과인 것으로 추정되었다. 항에스트로젠 작용성의 평가에서는 EROD 활성이 높게 측정된 5번 및 6번 분획시료에서 E2의 활성을 현저히 억제하여 다이옥신 유사물질의 항에스트로젠 작용성과 일치되는 결과를 보여 주었다.

4. 결론

본 연구에서는 국내환경 현안문제의 해결방안을 제시하는 한 방법으로서 Bioassay-Directed Chemical Analysis의 접근방법에 따라 대기환경의 미세먼지 오염의 주요인인 디젤분진을 대상으로 독성영향을 평가하고 원인을 규명함으로써 대기오염물질의 규제관리의 기초자료를 제시하고자 연구를 수행하고 있다. 자체 제작한 시료포집장치 즉, 디젤배기가스의 포집기와 cascade impactor를 연결한 장치를 이용하여 디젤연료를 사용하는 자동차에서 배출되는 입자상물질을 입자크기별로 포집한 결과 대부분이 미세먼지(PM 2.5)로 배출됨을 알 수 있었다. 포집한 디젤분진 PM2.5의 추출물에 대해 유전독성 및 내분비계 장애작용을 평가하였다. CYP1A 효소활성을 측정된 결과 디젤분진(PM2.5) 중에 다이옥신 유사물질을 확인하였으며 Comet assay, *in vitro* micronucleus test, Ames test에 의해 유전독성의 발현을 확인하였고 독성영향이 강한 분획에 대해 GC-MS로 분석한 결과 1,2,5,6 dibenzanthracene, chrysene, 1,2-benzanthracene, phenanthrene 및 fluoranthene등의 PAH류가 주요 원인물질로서 검출되었다. 이들 PAH류의 함량과 EROD 측정법에 의해 산출한 Bio-TEQ 함량을 비교한 결과 Bio-TEQ 함량이 높은 것으로 보아 검출된 물질이외에 다이옥신 유사작용을 나타내는 물질이 함유되어 있음을 알 수 있었다. 한편 E-screen assay에 의해 내분비계 장애작용을 확인하고 작용의 강도를 정량적으로 평가한 결과 분획에 따라 에스트로젠 작용과 항에스트로젠 작용이 나타났다. 특히 EROD활성이 높은 분획에서 항에스트로젠 작용이 나타나 다이옥신 유사물질의 작용성과 일치하는 결과를 보여 주었다. 이와 같이 Bioassay-Directed Chemical Analysis의 접근방법에 의해 다양한 평가가 가능함을 알 수 있다. 앞으로 본 연구에서 확립한 미세먼지 포집장치 및 독성평가체계는 미세먼지의 독성영향과 원인물질 및 배출원 확인 등에 매우 민감한 방법으로 활용이 가능한 것

으로 전망된다. 또한 본 연구체계를 활용하여 다양한 배출원에서 발생하는 미세먼지의 독성평가 자료를 축적해 간다면 위해성평가에 활용될 수 있는 기초자료로서 활용성이 높을 것으로 기대된다. 특히 bioassay는 매우 민감한 방법인 반면 재현성이 부족한 문제점이 있으므로 장기적인 자료축적을 통하여 결과의 활용성을 높이는 것이 요구된다.

참고문헌

- Binkova, B., Leníček, J., Beneš, I., Vidová, P., Gajdoš, O., Friedl, M., and Šrám, R.J. (1998) Genotoxicity of coke-oven and urban air particulate matter in vitro cellular assays coupled with ³²P-postlabeling and HPLC analysis of DNA adducts. *Mutation Research* 414, 77-94.
- Kreja, L., Seidel, H.-J. (2002) Evaluation of the genotoxic potential of some microbial volatile organic compounds (MVOC) with the comet assay, the micronucleus assay and the HPRT gene mutation assay. *Mutation Research* 513 143-150.
- Kittelson, D.B. (1988) Engines and Nanoparticles: A review. *J. Aerosol Sci.* 29, 575-588
- Rickeard, D.J., Bateman, J.R., Kwon, Y.K., McAughey, J.J., Dickens, C.J. (1996) Exhaust particulate size distribution: vehicle and fuel influences in light duty vehicles, *SAE*, 961-980.
- Singh, N.P., Tice, R.R., Stephens, R.E., and Schneider, E.L. (1991) A microgel electrophoresis technique for the direct quantitation of DNA damage and repair in individual fibroblasts cultured on microscope slides. *Mutation Research* 252, 289-296.
- Topinka, J., Schwarz, L.R., Kiefer, F., Wiebel, F.J., Gajdoš, O., Vidová, P., Dobiáš, L., Friedl, M., Šrám, R.J., and Wolff, T. (1998) DNA adduct formation in mammalian cell cultures by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and nitro-PAH in coke oven emission extract. *Mutation Research* 419, 91-105.