

생체시료를 이용한 환경보건감시체계 구축

홍윤철¹⁾, 김진희¹⁾, 박소연¹⁾, 이경호¹⁾, 유동호¹⁾, 송주희¹⁾, 이관희²⁾, 임종한²⁾³⁾, 하은희⁴⁾

1) 서울대학교 의과대학 예방의학교실 및 환경의학연구소

2) 인하대병원 산업의학과

3) 인하대학교 의과대학 사회의학교실

4) 이화여자대학교 의과대학 예방의학교실

1. 연구 배경

생물학적 지표 (biological markers)는 인체내의 생리학적, 세포학적 또는 분자 수준에서의 벌어지는 일을 제시해 주는 지표들을 (indicators signaling the events) 총칭한다. 생물학적 지표의 종류는 크게 노출 지표 (markers of exposure), 효과지표 (markers of effect), 감수성지표 (markers of susceptibility)로 분류하는데, 생물학적 지표를 ‘노출-질병의 연속선상’에서 다시 세분해보면, 노출 (exposure), 내부용량 (internal dose), 생물학적 효과용량 (biologically effective dose), 초기 생물학적 효과 (early biologic effect), 변화된 구조 및 기능 (altered structure/function), 임상적 질병 (clinical disease), 감수성지표 (susceptibility) 등의 요소로 되어 있다.

내부 용량으로는 발암물질의 소변내 대사산물 등이 있고 (예, polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites), 생물학적 효과 용량으로는 DNA adducts, 헤모글로빈 adducts가 있으며, 초기 생물학적 효과지표로는 염색체 이상, 유전자 돌연변이, 암유전자 활성화, 종양억제 유전자 비활성화 등이 있으며, 개개인의 감수성에 영향을 미칠 수 있는 요인으로는 glutathione-S-transferase, N-acetyl transferase 등 발암물질 대사효소의 유전자 다형성이나 DNA repair capacity의 차이 등이 있다.

이렇게 측정, 분석된 생체 감시 지표는 다음과 같은 장점을 갖는다. 첫째, 폭로와 질병 발생간의 발생 기전 및 관계 규명에 있어서 많은 도움을 준다. 둘째, 소량의 유해물질에 대한 측정이 가능하며 실제 노출량에 근접한 수치를 제공한다. 셋째, 질환이 임상적으로 발현되기 이전 단계의 사건을 인지한다. 넷째, 질환의 독립 및 종속 변수의 분류 오류를 현저하게 줄일 수 있다. 다섯째, 교란 변수 및 매개 변수의 변이성 (variability) 파악에 도움을 준다. 여섯째, 개인 또는 집단의 위해도 평가에 도움을 준다. 일곱째, 개인간의 유해물질에 대한 감수성의 차이를 평가할 수 있다.

환경보건감시체계는 대상인구집단에서 환경에 대한 노출과 이로 인한 건강영향을 지속적으로 모니터링하는 것이며 이때 환경노출 및 건강영향을 조기에 정확하게 평가하는 것이 매우 중요하다. 따라서 생체지표를 이용한 환경보건감시체계의 구축은 환경노출평가 및 자료원을 이용한 감시체계에서 한단계 발전된 것으로 환경오염에 의한 영향이 개체내에서 어떻게 나타나는지를 정확하게 평가할 수 있음으로써 환경오염에 노출된 특정집단을 추적감시하는 데에 가장 적합한 모형이다.

1) 연구수행 내용

(1) 생체지표 검사대상자 선정

서울과 인천의 환경성질환감시를 위한 코호트 대상자 각각 454명, 542명(전체 996명)을 선정하고 그들에 대한 환경오염 물질의 노출 평가를 위하여 생활 습관 및 식이 등을 설문 조사하고, 소변과 혈액을 채취하여 생체지표를 측정하였다.

(2) 노출 생체지표 분석

① 혈중 납 분석

전혈을 triton X-100과 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 용액으로 희석하여 원자흡광분석기-비블꽃이온화법으로 분석하였다. AAS (AAAnalyst 100, Perkin Elmer, Norwalk, CT)의 바탕보정과 표준물 첨가법에 의해 검량선을 작성하여 혈중 납 농도를 계산하였다.

② 소변의 코티닌 분석

Cotinine Direct ELISA Kit을 사용하여 분석하였다. 소변을 Horseradish peroxidase labeled cotinine으로 희석하여 이를 micro-plate well안에 있는 high affinity purified polyclonal antibody와 반응시킨 후 chromogenic substrate를 첨가하여 나타난 색깔의 강도를 ELISA를 이용하여 450 nm에서 측정한다. 농도는 측정된 값에 반비례하여 나타난다.

③ 소변의 1-OHP 분석

소변을 취하여 beta-glucuronidase/sulfatase로 conjugation form을 모두 자른 후 total 1-OHP농도를 HPLC-fluorescence detector(Ex 244, Em 388)로 분석하였다.

(3) 건강영향 생체시료 분석

① 소변의 8-OHdG 분석

ELISA kit (JaICA, Fukuroi, Japan)를 사용하여 연구 대상자들의 요중 8-OHdG 농도를 측정하였다. 일차 항체와 소변 시료를 8-OHdG로 코팅된 plate 내에서 1시간 (37 °C) 반응시킨 후 PBS 용액으로 3회 세척하였다. 이차 항체를 동일한 조건에서 반응시킨 후 PBS 용액으로 3회 세척하였다. 100 μl 의 enzyme substrate solution으로 처리하여 실온에서 15분간 반응시킨 후 100 μl 의 1N phosphoric acid로 반응을 종료시켜 spectrophotometer로 450 nm에서 흡광도를 측정하여 8-OHdG 농도를 계산하였다. 측정된 8-OHdG 농도는 요중 creatinine 농도로 보정하였다.

② 소변의 MDA 분석

소변에 phosphoric acid (0.5 M)와 TBA (thiobarbituric acid)를 넣고 95°C에서 1hr 처리한 후 HPLC-UV(wavelengths, 532 nm)로 분석하였다.

(4) 결과 분석

지역간 또는 성별에 따른 대상자들의 특성을 조사하기 위하여 chi-square test와 t-test를 수행하였다. 또한 각 대상자들의 특성이 건강영향 생체지표에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 general linear model을 사용하여 분석하였다.

2. 결과

1) 지역간 대상자들의 특성

서울과 인천 지역의 대상자들의 특성은 표 1-1과 같다.

운동 여부, 8-OHdG, 1-OHP, r-GTP 및 WBC에는 지역에 따른 차이가 없었으나, 인천에서 남성의 비율, BMI, 흡연률, 음주율, 납농도, eosinophil level이 유의하게 높았다($P < .05$). 하지만 MDA level은 서울이 인천보다 유의하게 높았다($P < .05$). 환경오염정도를 GIS를 통해 분석한 결과, PM은 인천이 서울보다 높았지만($P < .05$) NO 및 CO의 농도는 서울이 인천보다 높게 나타났다($P < .05$).

2) 성별에 따른 대상자들의 특성

남여에 따른 대상자들의 특성은 표 1-2와 같다.

평균나이와 8-OHdG 및 MDA level은 남성이 여성보다 유의하게 낮았지만($P < .05$) 나머지 변수, 즉, BMI, 흡연률, 음주율, 운동률, 코티닌, 납농도, r-GTP, WBC, Eosinophil level은 남성에서 여성보다 유의하게 높았다($P < .05$). 또한 영양소 섭취에 있어서 전반적으로 여성이 높은 영양소 섭취의 패턴을 가짐을 알 수 있었다($P < .05$).

3) 흡연이 각 생체지표에 미치는 영향

표 1-3,4,5,6,7,8에서 나타나는 바와 같이, 흡연여부 및 흡연량은 코티닌 level로 나타내었다. 흡연은 산화손상 지표인 MDA와 r-GTP, 그리고 염증 지표인 WBC 및 알러지 지표인 eosinophil에 유의하게 영향을 미치는 것을 알 수 있었다($P < .05$). 8-OHdG의 경우 전체 Population을 대상으로 하였을 때 별 영향을 주지 못하는 것으로 생각되었으나, 표 1-8과 같이 코티닌이 15 (ug/g cr) 이상인 사람들을 대상으로 하였을 때, 흡연이 8-OHdG에도 또한 영향을 주는 것으로 나타났다($P = 0.069$).

4) 납 노출이 각 생체지표에 미치는 영향

표 1-3,4,5,6,7,8에서 나타나는 바와 같이, 납 노출이 산화손상지표인 MDA와 r-GTP에 유의하게 영향을 미치는 것을 알 수 있었다($P < .05$). 그러나 납이 8-OHdG에는 영향을 주지 않는 것으로 보여졌다($P > .05$),

Table 1-1. Demographic characteristics of the study population.

Variables	Seoul (n = 454)	Incheon (n = 542)	p-Value*
Age [mean ± SD (years)]	52.43 ± 7.79	51.29 ± 8.84	0.0323
Sex (% male)	41.78	54.68	< .0001
Body mass index [mean ± SD (kg/m ²)]	23.29 ± 2.63	24.17 ± 2.71	< .0001
Smoking status (% smoker)	13.43	23.17	0.0002
Alcohol consumption (% drinker)	45.71	53.40	0.0202
Exercise (% exerciser)	59.72	54.60	0.1148
Blood lead level [mean ± SD (µg/dL)]	3.89 ± 2.56	4.70 ± 1.90	< .0001
Urine 8-OHdG level [mean ± SD (ug/g cr)]	83.2 ± 50.3	80.9 ± 73.4	0.5940
Urine MDA level [mean ± SD (umol/g cr)]	37.0 ± 30.5	32.2 ± 17.6	0.0150
Urine 1-OHP level [mean ± SD (ng/g cr)]	4.17 ± 7.59	4.57 ± 15.70	0.6292
r-GTP [mean ± SD (U/L)]	37.4 ± 82.6	41.2 ± 49.6	0.5735
WBC [mean ± SD (x 10 ⁹ cell/L)]	5.8 ± 1.6	5.9 ± 1.9	0.4612
RBC [mean ± SD (x 10 ¹² cell/L)]	4.9 ± 0.7	4.8 ± 0.5	0.0634
Eosinophil [mean ± SD (%)]	2.6 ± 2.3	3.5 ± 3.6	< .0001
GIS			
PM [3년간 평균(2000-2002)]	38.16 ± 31.94	42.51 ± 14.82	0.043
NO [3년간 평균(2000-2002)]	15.68 ± 23.63	5.34 ± 7.19	< .0001
SO [3년간 평균(2000-2002)]	3.96 ± 2.40	4.37 ± 4.64	0.128
CO [3년간 평균(2000-2002)]	262.92 ± 167.00	91.67 ± 73.26	< .0001

*p-Value from chi-square test for categorical variables or t-test for continuous variables analysis.

Table 1-2. Demographic characteristics, lead exposure, smoking status, oxidative stress, inflammation, or allergy marker levels, and nutrient consumption according to sex.

Variables	Male (n = 480)	Female (n = 504)	p-Value*
Age [mean ± SD (years)]	50.8 ± 8.8	52.1 ± 7.9	0.0003
Body mass index [mean ± SD (kg/m ²)]	24.2 ± 2.6	23.5 ± 2.8	0.0001
Smoking status (% smoker)	35.7	1.3	< .0001
Alcohol consumption (% drinker)	74.89	24.51	< .0001
Exercise (% exerciser)	61.6	52.6	0.0061
Urine cotinine level [mean ± SD (ug/g cr)]	68.8 ± 180.0	1.9 ± 10.4	< .0001
Blood lead level [mean ± SD (ug/dL)]	5.04 ± 2.42	3.67 ± 1.86	< .0001
Urine 8-OHdG level [mean ± SD (ug/g cr)]	76.2 ± 60.2	87.8 ± 72.7	0.0144
Urine MDA level [mean ± SD (umol/g cr)]	32.5 ± 19.2	35.1 ± 26.2	0.1145
Urine 1-OHP level [mean ± SD (ng/g cr)]	4.49 ± 10.38	4.39 ± 16.41	0.9189
r-GTP [mean ± SD (U/L)]	58.4 ± 77.1	22.5 ± 22.7	< .0001
WBC [mean ± SD (x 10 ⁹ cell/L)]	6.24 ± 1.91	5.38 ± 1.42	< .0001
RBC [mean ± SD (x 10 ¹² cell/L)]	5.08 ± 0.52	4.58 ± 0.54	< .0001
Eosinophil [mean ± SD (%)]	3.7 ± 3.7	2.5 ± 2.4	< .0001
Nutrient consumption ^b			
Ca (mg)	459.4 ± 319.7	572.3 ± 377.0	< .0001
P (mg)	985.9 ± 580.0	1055.2 ± 535.1	0.0488
Fe (mg)	11.6 ± 8.1	13.2 ± 8.2	0.0022
K (mg)	2457.4 ± 1467.7	2872.1 ± 1581.7	< .0001
Vitamin A (μgRE)	570.8 ± 466.1	687.0 ± 535.0	0.0004
Vitamin B2 (mg)	1.05 ± 0.70	1.14 ± 0.62	0.0401
Vitamin B6 (mg)	1.69 ± 1.09	1.83 ± 0.95	0.0328
Vitamin C (mg)	110.4 ± 83.3	153.0 ± 114.8	< .0001
Folic acid (μg)	236.9 ± 159.5	280.9 ± 173.1	< .0001
Retinol (μg)	71.9 ± 114.0	86.8 ± 100.0	0.0326
Carotene (μg)	2884.3 ± 2417.9	3498.8 ± 2828.9	0.0003
Fiber (g)	6.09 ± 3.62	7.13 ± 4.09	< .0001
Water (%)	1183.3 ± 603.1	1334.4 ± 667.8	0.0003
Vitamin E (mg)	8.50 ± 7.80	10.70 ± 7.24	0.0145

*p-Value from chi-square test for categorical variables or t-test for continuous variables analysis.

^bOther nutrients were not significantly different between male and female.

Table 1-3. Effect of individual characteristics on MDA level.

Variables	Univariate		Multivariate	
	β (SE)	<i>p</i> -Value ^a	β (SE)	<i>p</i> -Value ^a
Age	0,0150 (0,00)	< ,0001	0,0146 (0,00)	< ,0001
Sex	0,0738 (0,03)	0,0327	0,0827 (0,04)	0,0596
BMI	- 0,0053 (0,01)	0,4233		
Cotinine	0,0144 (0,01)	0,0454	0,0349 (0,01)	< ,0001
Alcohol	- 0,1390 (0,04)	0,0001	- 0,1240 (0,04)	0,0020
Exercise	- 0,0421 (0,04)	0,2330		
Lead	0,1196 (0,04)	0,0029	0,1512 (0,04)	0,0005

^a*p*-Value from general linear model.

Table 1-4. Effect of individual characteristics on 8-OHdG level.

Variables	Univariate		Multivariate	
	β (SE)	<i>p</i> -Value ^a	β (SE)	<i>p</i> -Value ^a
Age	0,0132 (0,00)	< ,0001	0,0121 (0,00)	< ,0001
Sex	0,1221 (0,04)	0,0035	0,0458 (0,05)	0,3668
BMI	0,0005 (0,01)	0,9570		
Cotinine	- 0,0090 (0,01)	0,3050		
Alcohol	- 0,1514 (0,04)	0,0006	- 0,0845 (0,05)	0,0979
Exercise	- 0,0595 (0,04)	0,1751		
Lead	- 0,0160 (0,05)	0,7440		

^a*p*-Value from general linear model.

Table 1-5. Effect of individual characteristics on r-GTP level.

Variables	Univariate		Multivariate	
	β (SE)	<i>p</i> -Value ^a	β (SE)	<i>p</i> -Value ^a
Age	- 0,0058 (0,00)	0,0948	0,0043 (0,00)	0,2376
Sex	- 0,7744 (0,05)	< ,0001	- 0,5642 (0,08)	< ,0001
BMI	0,0695 (0,11)	< ,0001	0,0589 (0,01)	< ,0001
Cotinine	0,0979 (0,01)	< ,0001	0,0326 (0,01)	0,0177
Alcohol	0,5089 (0,06)	< ,0001	0,1731 (0,07)	0,0203
Exercise	0,0036 (0,06)	0,0621	0,0416 (0,06)	0,4973
Lead	0,4536 (0,06)	< ,0001	0,1754 (0,09)	0,0417

^a*p*-Value from general linear model.

Table 1-6. Effect of individual characteristics on WBC count.

Variables	Univariate		Multivariate	
	β (SE)	p -Value ^a	β (SE)	p -Value ^a
Age	- 0,0025 (0,00)	0,0128	- 0,0013 (0,00)	0,2706
Sex	- 0,1361 (0,02)	< ,0001	- 0,0745 (0,02)	0,0021
BMI	0,0048 (0,00)	0,1543		
Cotinine	0,0355 (0,00)	< ,0001	0,0273 (0,00)	< ,0001
Alcohol	0,0800 (0,12)	< ,0001	0,0155 (0,02)	0,4850
Exercise	- 0,0178 (0,02)	0,3049		
Lead	0,0582 (0,02)	0,0009	- 0,0222 (0,02)	0,3479

^a p -Value from general linear model.

Table 1-7. Effect of individual characteristics on eosinophil count.

Variables	Univariate		Multivariate	
	β (SE)	p -Value ^a	β (SE)	p -Value ^a
Age	0,0015 (0,00)	0,6316	0,0059 (0,00)	0,1347
Sex	- 0,3053 (0,05)	< ,0001	- 0,0922 (0,08)	0,2663
BMI	0,0411 (0,01)	< ,0001	0,0362 (0,01)	0,0029
Cotinine	0,0543 (0,01)	< ,0001	0,0363 (0,01)	0,0139
Alcohol	0,2573 (0,05)	< ,0001	0,1040 (0,08)	0,1719
Exercise	0,0036 (0,05)	0,9456		
Lead	0,2221 (0,05)	< ,0001	0,0400 (0,08)	0,6291

^a p -Value from general linear model.

Table 1-8. Effect of individual characteristics on 8-OHdG level in subject with cotinine level >15 ug/g cr.

Variables	Univariate		Multivariate	
	β (SE)	p -Value ^a	β (SE)	p -Value ^a
Age	0,0010 (0,00)	0,0383	0,0009 (0,00)	0,0549
Sex	- 0,0187 (0,02)	0,3273		
BMI	- 0,0016 (0,00)	0,2912		
Cotinine	0,0003 (0,00)	0,0509	0,0003 (0,00)	0,0691
Alcohol	- 0,0058 (0,01)	0,5272		
Exercise	- 0,0040 (0,01)	0,4409		

^a p -Value from general linear model.

3. 결론

1) 지역간 환경오염노출의 차이

서울과 인천지역 거주자들에서 혈액 및 소변 시료를 이용하여 환경오염의 노출정도를 살펴본 결과 미세분진과 납에 대한 노출은 인천에서 서울보다 높게 나타났고 NO₂ 및 CO에 대한 노출은 서울에서 높게 나타났다. 이러한 결과는 생체시료 및 지리정보시스템을 이용하여 지역간 환경오염노출의 차이를 규명할 수 있고 이러한 노출의 차이가 질병 및 건강에 미치는 영향을 추적 감시할 수 있는 기반을 제공하는 것이다. 특히 특정환경오염물질에 과대노출되고 있는 지역을 확인하여 지역별 환경오염관리의 우선순위를 정하는 데에도 도움이 될 것이다.

2) 성별 환경오염노출의 차이

남자와 여자는 생물학적인 차이 이외에도 생활습관의 차이, 직업의 차이 등에 의해서 환경오염노출의 차이가 생길 수 있고 또 이 결과로 환경오염노출에 의한 건강영향의 차이가 나타날 수 있다. 일반적으로 이번 생체지표 조사를 통하여 남성이 여성보다 납에 더 많이 노출되고 또 음주 및 흡연률이 높은 것을 알 수 있었다. 실제 이러한 환경오염노출의 차이가 환경성 질환 (폐암, 만성호흡기질환, 천식, 심혈관질환, 뇌졸중 등) 발생률의 차이를 초래하는 지의 여부를 확인하기 위해서 추적감시체계의 구축이 필요하다.

3) 흡연의 영향

흡연은 개인 습관이라고 할 수 있지만 실제 흡연을 하지 않는 사람도 담배연기에 노출되게 함으로써 상당한 건강영향을 초래할 수 있다. 따라서 본 과제에서는 흡연의 생체지표인 소변중 cotinine을 측정함으로써 직접 흡연 및 간접흡연도 같이 평가하였다. 분석결과 흡연에 대한 노출로 인해서 인체내에서 산화적 손상이 증가되는 것을 확인하였으며 이는 암 및 심혈관질환의 발생 등 다양한 질병과 관련이 있다는 것을 나타내는 것이다. 또한 흡연은 일반 환경오염노출의 영향평가를 수행하는 데 있어서 중요한 교란변수로 작용할 수 있으므로 이에 대한 정확한 평가가 필요하다.

4) 납 노출에 의한 건강영향

본 과제에서 납 노출은 혈중 납 농도를 측정하여 평가하였다. 분석결과 혈중 납 농도는 산화손상 지표인 MDA 및 rGTP 등과 유의한 관련성이 있었으며 염증지표와의 관련성도 나타났다. 산화손상 및 염증반응은 암 및 심혈관질환의 발생과 관련된 병리적 기전이므로 이러한 소견은 추적감시체계를 통하여 질병발생에 직접 관계되는지를 밝혀야 한다. 특히 그동안 비교적 저농도로 평가되어 건강영향이 크지 않을 것으로 생각되어왔던 환경중 납농도에서 이러한 영향이 나타남으로 그동안 관리의 우선순위가 떨어졌던 환경중 납노출에 대한 관리가 강화되어야 할 것이다.

5) 생체지표를 이용한 감시체계구축의 의미

생체지표는 환경오염노출과 이로 인한 건강영향을 직접 생체내에서 측정, 분석함으로써 환경오염의 영향을 간접적인 자료를 통해서가 아니라 직접적으로 분석할 수 있다는 장점이 있다는 것을 확인하였다. 이번 1차년도 연구조사는 대상자 자료의 구축 및 일부 분석에 국한된 것이므로 다소 한계는 있지만 환경성 납 노출이 건강영향을 일으킨다는 것을 제시하였고 또 대상자들을 추적감시할 수 있는 체계를 구축하였으므로 생체지표 감시체계의 틀을 마련하였다고 할 수 있다. 향후 2차년도이후의 연구조사에서 다양한 생체지표를 측정, 분석하고 또 대상자들의 건강영향을 추적함으로써 환경오염에 의한 건강영향을 규명할 수 있을 것이다.