

디젤엔진 排氣物質의 變異原性 研究

林國煥 · 襄恩相 · 金永煥 · 金光鍾*

高麗大學校 保健專門大學

*高麗大學校 環境醫學研究所

Mutagenicity of Diesel Exhaust Emission by Micronucleus Test

Kook Hwan Rhim · Eun Sang Bae

Young Whan Kim · Kwang Jong Kim*

Junior College of Allied Health Sciences, Korea University

**The Institute for Environmental, Health Korea University*

ABSTRACT

Interest in the studies of diesel exhaust emission has been increasing by the expected increase in the use of diesel powered automobiles out of consideration of fuel economy. It was well known that diesel exhaust emission was mutagenic in the bioassay as Ames test.

The authors tried to find out the cytogenetic effect of diesel exhaust emission by the operational condition of engine such as speed and load. For the investigation of those effects, 66 male mice of ICR strain were used. The benzene-ethanol extracts of diesel exhaust emission were injected intra peritoneum 25mg/kg and 50mg/kg respectively. To evaluate the cytogenetic effect, mouse bone marrow micronucleus test was carried out.

The frequency of micronucleus was different among the various groups according to the operational conditions of engine. The frequency of micronucleus in idling group was the highest of all the groups; the subgroup of 50mg/kg showed the rate of 1.30%, 25mg/kg subgroup 0.55%. And the group of 2000rpm with 50% load showed the lowest rate of micronucleus appearance as 0.20% and 0.15%.

In general, the frequency of micronucleus was shown higher in proportion to load and was shown inversely proportional to speed.

I. 서론

근래 폐암의 발생률이 높아지고 이로 인한 사망

율 또한 증가하고 있다. 폐암의 최대 원인은 흡연으로 생각되어지고 있지만, 폐암발생율이 점점하고 있는 중요한 이유중의 하나로 증가하는 자동차 배출가스의 영향이 꼽히고 있다.¹⁾ 에너지의 경제

*이 논문은 환경처의 환경과학연구비 지원사업에 의하여 연구되었음.

성 때문에 근년 디젤엔진 자동차의 생산 및 사용이 많아지고 있으며, 디젤엔진은 높은 수준의 호흡성 입자유기물(respirable particulate organic matter)을 배출하게 된다.²⁾ 이 중에는 변이원성이 강한 유해물질이 다량 함유되어 있는 것으로 알려지고 있다.

미국의 경우 무연휘발유를 사용하여 연간 14,000마일을 달린 자동차 1대는 연간 0.195kg의 입자상물질을 배출하는데 비하여, 같은 거리를 달린 디젤엔진 승용차는 6.99kg으로서 약 36배나 많은 입자상물질을 배출하고 있다.³⁾

또한 연간 69,000마일을 달리는 버스나 트럭은 1대당 연간 124kg 및 112kg의 입자상 물질을 배출함으로써 디젤승용차의 약 17배의 배출량이 된다.

이와 같은 디젤엔진의 배기물질중에는 입자상물질뿐 아니라 가스성분도 함유되어 진다. 배출시의 가스온도는 고온이지만 시료채취시에는 대기온도 가까이로 낮추어서 포집해야만 한다. 채취된 입자상물질에는 대부분의 5환이상의 다환방향족 탄화수소(PAH)와 C18 이상의 탄화수소도 흡착되어 진다.⁴⁾

강한 변이원성을 가지는 것으로 알려진 것은 nitroarene으로서,⁵⁾ 이 중에서 Pitts Jr. 등 (1982)은⁶⁾ 1-nitropyrene, 6-nitrobenzo[a]pyrene, 9-nitroanthracene 및 5H-phenanthro[4,5-bcd]pyran-5-one등이 강하게 작용하는 직접변이원이라고 보고하였으며, Nachatman 등(1981)⁷⁾은 2-nitrofluorene을 추가 보고하였다.

그러나 PAH가 S-9이 혼합될 때 활성화되는 것에 비하여, 디젤배기물질은 포유동물의 효소없이도 변이원성을 나타내는 독특한 특성을 지니고 있다.⁷⁾

국내에서도 디젤엔진 배기물질 오염에 대한 중요성이 인식되어 조등(1989)⁸⁾이 매연방지를 위한 연구결과를 보고하였으며, 허등(1989)⁹⁾은 디젤분진의 유전특성을 연구 보고한 바 있다. 그러나 디젤엔진의 회전수(rpm)와 부하량(load)등의 운전 조건에 따른 조사연구는 이루어지지 않았다. 따라서 저차들은 가장 많이 운행되고 있는 대형 디젤엔진의 대표적인 운행모드에 따른 배기물질을 채취하여, in vivo 실험으로서 마우스 갈수의 소핵실험

(micronucleus test)을 실시하여 변이원성을 조사하였기에 그 결과를 보고한다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

1) 실험동물

4주령된 ICR계 숫컷 마우스를 한국과학기술원으로 부터 분양받아 3주간 예비사육으로 실험실에 적응시킨 후 30gr 전후의 건강한 66마리를 실험에 사용하였다.

사육실은 온도 20~25℃, 습도 50~60%범위를 유지시켰고, 사료(주, 삼양사)와 물(상수)은 자유로이 섭취케 하였다.

2) 실험물질

(1) 실험물질 채취

① 디젤엔진 배기물질 포집장치

디젤엔진으로 부터 배기물질을 포집하는 장치는 Fig. 1에 표시한 바와 같이 동력계, 대형디젤엔진, 회석터널, 하이볼륨 에어샘플러, 직접 배기 가스 분석계 등으로 구성되어 있다.

엔진동력계는 전기식 동력계로서 일본 NIS-HISHIBA사의 NEDD146H(300ps)이며, 직접 배출가스 분석기는 일본 HORIBA사의 MEXA8120을 사용하였다. 디젤엔진은 우리나라의 시내버스에 많이 사용하는 Table 1과 같은 규격을 가진

Table 1. Specification for heavy duty diesel engine

Items	Specification
Type	D1146
Description	4 cycle diesel engine
Cylinder type of combustion chamber	In line 6 cylinder
Type of combustion chamber	Direct injection
Bore × stroke	111 × 139
Displacement volume	8071cc
Compression ratio	17.6 : 1
Maximun horsepower	187 HP/2500 rpm
Maximun torque	58.5kg.m/1600 rpm
Fuel consumption	156g/ps h/1600 rpm
Idle engine speed	670rpm
Cooling system	Water cooling type

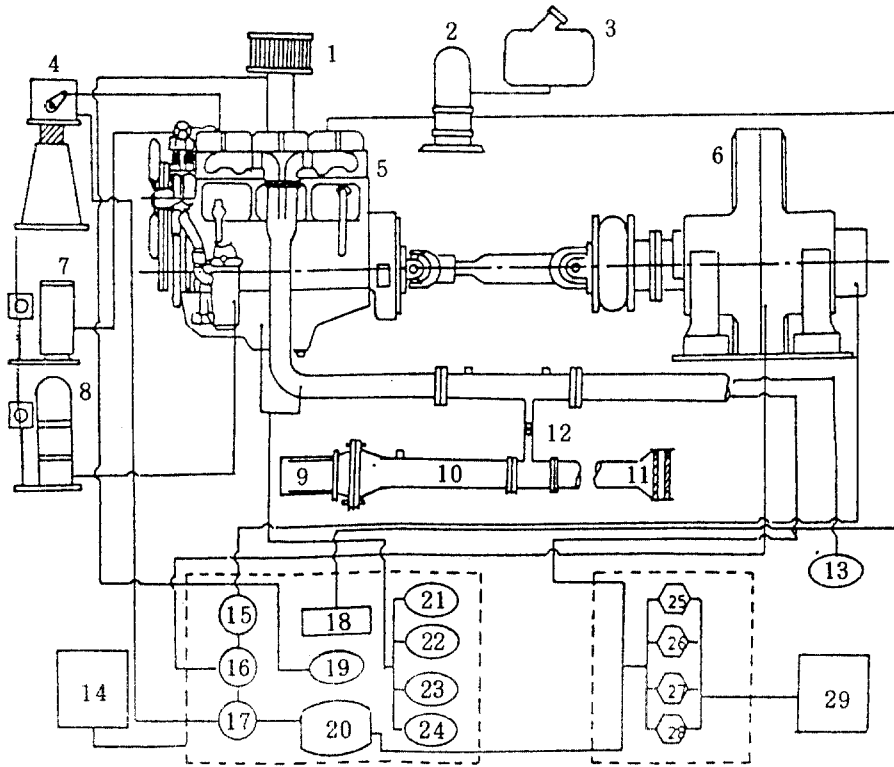


Fig. 1. Schematic diagram of diesel particulate measuring apparatus.

- | | |
|-------------------------------|---------------------------------|
| 1) Laminar air flow meter | 16) Torque meter |
| 2) Fuel flow detector | 17) Engine throttle meter |
| 3) Fuel tank | 18) Fuel flow meter |
| 4) Throttle actuator | 19) Air flow meter |
| 5) Test engine | 20) Auto mode controller |
| 6) Engine dynamometer | 21) Cooling water |
| 7) Cooling water controller | 22) Lubrication oil temperature |
| 8) Lubrication oil controller | 23) Exhaust gas temperature |
| 9) High volum air sampler | 24) Lubrication oil pressure |
| 10) Dilution tunnel | 25) Total hydrocarbon analyzer |
| 11) Air filter | 26) Carbon monoxide analyzer |
| 12) Flow controller | 27) Carbon dioxide analyzer |
| 13) Smoke meter | 28) Nitrogen oxides analyzer |
| 14) Performance data recorder | 29) 6-pen recorder |
| 15) Engine speed meter | |

D1146엔진을 사용하였으며, 입자상물질을 채취하기 위한 장치는 회석터널에 하이볼륨 에어샘플러를 연결하여 직접 포집하였다.

② 입자상 물질 포집방법

③ 엔진의 운전조건

엔진의 운전조건은 아이들링시, 중간엔진회전 속도(intermediate rpm)인 1500rpm 및 최대회전 속도의 80%인 2000rpm에서 최대부하(100%)와 50% 부하로 각각 운전하였다.

④ 연료 및 윤활유

연료는 호남정유(주)의 시중에서 판매하고 있는 경유를 사용하였으며, 윤활유는 한국셀석유(주)의 육상3종 특2호(SAE 20W/20)를 사용하였다.

경유의 성상은 Table 2와 같다.

㉔ 배기물질 포집방법

디젤엔진은 엔진동력계상에서 일정한 조건으로 운전할때 배출되는 입자상물질을 깨끗한 실외공기로 회석시켜 회석배기가스의 온도가 50℃이하가 되도록 배출가스와 회석공기의 비를 조절하였다. 회석터널에서 회석한 배출가스 정량은 하이볼륨 에어샘플러를 이용하여 여과포집하고, 포집된 입자상물질의 무게는 여과포집 전후의 여과지 무게차에 의하여 구하였다.

여기에 사용된 유리섬유제 여과지(Whatman, 10×8in)는 20℃ ± 2℃ 및 상대습도 50±5%로 유지한 실내에서 1야간 방치한후 화학천칭을 사용하여 여과지의 무게를 0.1mg 단위까지 측정하고 각각의 엔진운전조건에서 입자상물질을 포집한 후 다시 상기실내조건에서 1야간 방치한 후 무게를 측정하여 입자상물질 포집전후에 있어서의 무게차를 구하였다.

엔진조건별 입자상물질 포집량 및 포집조건은 Table 3과 같다.

(2) 유기물 추출

디젤분진을 포집한 filter paper(18×23cm)를 1/2~1/4 크기로 자른 다음 다시 여지를 잘게 잘라 삼각 flask에 넣고 추출액으로서 benzene : ethanol(4 : 1) 혼합용액 150ml를 이용하여 Transistor/Ultrasonic T-14 (L & R manufacturing company, England)에 넣고 30분간 분진중 유기물질을 추출하였다.

Table 2. Fuel properties

Items	Properties
Ignition temperature	57
Distillation temp. 90%	353℃
Cu corrosion (100℃, 3h)	1
S content (Wt%)	0.4
10% residual C	0.02
Ash (%)	0.01
Cloud point	-10℃
Cetane index	48
Dynamic viscosity (Sct 37. 8℃)	3.352

Filter paper를 여과한 후 여과액을 vaccum rotary evaporator로 감압농축한 후 10ml 용량의 tube에 옮겨 진공 데시케이터에서 건조시킨 후 추출물의 무게를 측정하였다. 디젤분진에서 추출한 tar는 didmethylsulfoxide(DMSO)에 필요한 농도로 용해하여 시료로 사용하였다.

2. 실험방법

1) 실험군 구분

실험군은 1,500rpm 100%부하군 및 50%부하군, 2,000rpm 100%부하군 및 50%부하군, 그리고 공회전(idling)군으로 구분하였고, 각군은 시료물질 투여량에 따라 25mg 및 50mg의 아군으로 구분하여 각각 6마리씩 배분하였다.

또한 대조군은 소핵유발 양성대조군과 음성대조군으로 구분하였다.

2) 물질투여

추출한 시료물질을 DMSO에 용해시켜 mouse에 각각 25mg 및 50mg/10ml/kg을 복강주사(ip)하였다.

Table 3. Diesel particulate sampling condition and result

Engine speed (rpm)	Condition load (kg, m)	Diluted exhaust gas temperature	Sampling time	Sampling weight
Idle		31℃	20 min	0.0868g
1600	58.9 (100%)*	45℃	12 min	0.1389g
1600	29.5 (50%)	50℃	20 min	0.1513g
2000	57.3 (100%)	45℃	10 min	0.1843g
2000	28.5 (50%)	50℃	15 min	0.1010g

* : Load rate

대조군중 음성대조군에는 용매인 DMSO만을 10ml/kg 투여하였고, 양성대조군에는 소핵유발 물질로 이미 알려진 mitomycin C 0.875mg/kg의 량을 24시간 간격으로 2회 복강주사 하였다.

3) 표본제작

물질투여 24시간후 경추탈구에 의하여 mouse를 희생시키고 양측의 대퇴골을 적출하였다.

Schmid의 원법¹⁰⁾에 준하여 대퇴골의 양단을 절단하고 fetal bovine serum 약 0.4ml를 1ml 주사기에 취한 후 골수내에 주입하여 골수세포를 씻어낸다.

이를 원심관에 옮겨 Pasteur pipette로 세포의 덩어리를 깨고 단세포 부유액을 만든다. 부유액을 1,000rpm으로 5분간 원심분리 한 다음 상등액을 제거하고, Pasteur pipette로 원심관에 남은 소량의 혈청을 이용하여 세포현탁액을 만든다. 소량의 세포현탁액을 청결한 2장씩의 slide glass에 도말한 다음 2/3정도에서 500개의 다염성적혈구(PCE)를 관찰할 수 있도록 세포의 농도를 조절한다. 이를 하룻밤 자연 건조시킨 후 methanol(99.9%)에 5분간 고정시킨다.

2.5% Giemsa 액으로 실온에서 30분간 염색한 다음 Sørensen 완충액(pH 6.8)으로 세척하고, 탈ion수에서 1회 세척하였다.

4) 소핵의 관찰

1,000배율의 광학현미경을 사용하여 1,000개의 다염성적혈구(PCE)중 소핵을 지닌 소핵다염성적혈구(MNPCE)수를 세어 생성빈도를 백분율(%)로 구하였다.

소핵의 판단기준은 첫째 소핵의 직경이 주핵의 3분의 1이하인 것, 둘째 핵의 색이 주핵의 색과 같거나 다소 옅은 것, 셋째 광의 굴절이 있는 것, 넷째 소핵의 위치가 주핵의 직경 3~4배 이내에 있는 것을 포함시켰다.

각 실험군의 통계학적인 유의성 검정은 student's t-test를 사용하였다.

III. 성적 및 고찰

Diesel배출 gas의 발암성에 대하여 1955년 Kotin¹¹⁾ 등이 여지상에 포집한 입자상 물질을 benzene으로 추출한 후 mouse의 피부에 도포하여 피

부 유두종과 편평상피암이 발생하였음을 연구 보고한 이래 발암의 원인이 되는 화학물질에 대하여 많은 연구가 계속되고 있다.

송하¹²⁾는 diesel 배출 gas에서 benzo(a)pyrene, pyrene, benzo(a)fluoranthene 및 benzo(b,h)phenanthrene등 10여종의 변이원성 물질을 분석하였고, 특히 강력한 direct Mutagen인 dinitropyrene(6700 rev/ μ g TA98), nitrofluranthenes(3, 8) (280000 rev/ μ g TA98) 및 dinitro-9-fluorenone(2, 7) (6700 rev/ μ g TA98) 등 10여종의 nitroarene을 분석하였다.

또한 Nachtman(1981)⁷⁾, Pitts(1981)⁵⁾, Schuetzle¹³⁾(1981) 등도 이들 배출 물질들이 TA 98 및 TA 98NR 균주에 대하여 강력한 변이원성 물질임을 확인하였다. 그러나 변이원성 물질의 생체내 흡수, 대사등을 고려하여 본 연구에서 in vivo계의 1차 시험인 소핵 시험을 실시하였다.¹⁴⁾

소핵시험은 화학물질에 의한 분열세포의 염색체분석, 방추체 기능저해작용으로 인하여 형성된 소핵(micronucleus)을 관찰하여 피검물질의 염색체 이상 유발기능을 추정하는 방법으로서 미국 EPA의 TSCA(유해성 화학물질규제법)나 일본 후생성 압 연구반에 변이원성 시험항목으로 채택되어 인정되고 있는 시험이다.

그러나 소핵시험은 생체시험이기 때문에 시험동물의 종, 계통, 연령 및 성에 따라 차이가 있으며, 시험물질의 투여경로, 횟수, 투여로부터 희생될 때까지의 시간 등에 따라라도 실험결과에 변화를 줄 수가 있다.

디젤엔진의 운전상태에 따른 배기물질의 추출물이 mouse골수에 미친 소핵 시험의 결과는 Table 4 및 5와 같다. 즉 디젤엔진 배기추출물 50mg/kg을 복강 주사하였을 경우 mouse 8마리가 사망하였으며 공회전군에서 4마리로 가장 많았다. 소핵출현율에 있어서는 공회전군이 $1.30 \pm 0.21\%$ 로 가장 높았으며($p < 0.01$), 1500rpm군이 100%와 50% 부하시 각각 $0.45 \pm 0.21\%$ 및 $0.40 \pm 0.10\%$ 로 높았고($p < 0.05$), 2000rpm군에서는 $0.45 \pm 0.17\%$ 와 $0.20 \pm 0.08\%$ 로 비교적 낮았다.

또한 전체 적혈구수에 대한 PCE의 비를 살펴본다. 이는 PCE의 감소가 골수세포의 분열을 억제하는 것을 의미하게 되므로 소핵시험시 관찰할

Table 4. Frequency of micronucleus in the extracts injection of 50mg/kg in mouse

Engine condition		No. of mouse (death)	MNPCE (% ± S.D.)	PCE/RBC (% ± S.D.)
Speed(rpm)	Load(%)			
Idling		6 (4)	1.30 ± 0.21**	26.7 ± 4.6
1,500	100	6 (2)	0.45 ± 0.12*	50.4 ± 12.4
	50	6 (1)	0.40 ± 0.10*	44.9 ± 10.3
2,000	100	6	0.45 ± 0.17	41.4 ± 3.5
	50	6 (1)	0.20 ± 0.08	42.5 ± 6.8
Negative cont.		3	0.10 ± 0.10	52.1 ± 7.4
Positive cont. #		3	9.20 ± 2.42	38.0 ± 8.7

: treated with mitomycin C 0.875mg/kg twice.

* : p<0.05 compared with control group.

** : p<0.01 compared with control group.

Table 5. Frequency of micronucleus in the extracts injection of 25mg/kg in mouse

Engine condition		No. of Mouse (death)	MNPCE (% ± S.D.)	PCE/RBC (% ± S.D.)
Speed(rpm)	Load(%)			
Idling		6 (2)	0.55 ± 0.21*	40.2 ± 5.6
1,500	100	6 (1)	0.30 ± 0.05	56.8 ± 11.4
	50	6 (1)	0.35 ± 0.08*	41.4 ± 5.2
2,000	100	6	0.25 ± 0.07	58.4 ± 3.9
	50	6	0.15 ± 0.08	47.5 ± 6.3
Negative cont.		3	0.10 ± 0.10	52.1 ± 7.4
Positive cont. #		3	9.20 ± 2.42	38.0 ± 8.7

: treated with mitomycin C 0.875mg/kg twice.

* : p<0.05 compared with control group.

것을 권고하고 있다. 대조군이 52.1%를 나타내고 있음에 비하여 공회전군이 26.7%로 매우 낮았다.

25mg/kg을 투여했을 경우에는 Table 5와 같이 소핵출현율이 공회전군에서 0.55 ± 0.21%로 가장 높았으며 다음으로 1,500rpm군이 비교적 높았다. 전체 적혈구수에 대한 PCE의 비에 있어서도 공회전군이 40.2%로 가장 낮게 나타나고 있다.

이와같은 결과는 趙등(1985)¹⁵⁾이 낮은 회전수의 운전조건에서 더 많은 양의 HC류가 배출된다는 보고나, Schuetzle(1981)¹⁶⁾의 디젤엔진에서 1-nitropyrene (470 rev/nM) 및 1,3-dinitropyrene (54,047rev/nM)같은 변이원성물질이 idling시 고속회전할 때 보다 약 2~4배 높게 배출되었다는 보고와 비슷한 경향을 나타내었다

이상의 실험결과 디젤엔진의 배기물질이 세포 독성을 일으키고 있음을 확인할 수 있었으며, 엔

진운전 상태에 있어서는 엔진의 부하에 따른 독성은 뚜렷하지 않았으나 회전수에 있어서 rpm이 낮을수록 독성이 강하였고, idling의 경우에 가장 강한 독성을 나타내었다.

IV. 결 론

디젤엔진 운전조건에 따른 배기물질의 변이원성을 조사하기 위하여 ICR계 숫컷 mouse를 사용하여 in vivo계의 1차 시험인 micronucleus test를 실시하였다.

디젤엔진배기물질의 benzene-ethanol 추출물은 엔진 운전 상태에 따라서 소핵 출현 빈도에 차이가 있었다.

엔진의 운전조건에 따른 소핵출현율은 배기물 추출량을 50mg/kg 투여하였을 때 공회전(idling)

시가 1.3%로 가장 높았고, 100% 부하의 1,500 rpm과 2,000rpm시 모두 0.45%소핵출현율을 나타냈으며, 회전수 2,000rpm의 50% 부하시에 0.20%로 가장 낮았다.

또한 25mg/kg의 투여시에도 공회전(idling)이 0.55%로 가장 높은 소핵출현율을 나타냈으며, 2,000rpm의 50%부하시 0.15%로 가장 낮은 소핵출현율을 나타냈다.

이상의 결과 디젤엔진 배기물질이 세포독성을 야기시키고 있음을 실험적으로 확인할 수 있었으며 엔진운전상태별로는 공회전(idling)의 경우에 독성이 가장 강함을 나타내었다.

참 고 문 헌

- 1) Yoshinari Ohnishi and Takemi Kinowchi, Mutagenic Activity of Diesel Emission, Toxicology Forum, 6(4) : 335-335, 1983.
- 2) National Academy of Sciences, Health Effects of Exposure to Diesel Exhaust, National Academy Press, Washington, D.C., 1980.
- 3) Spdringer, K.J., Diesel emissions, a worldwide concern, in Toxicological Effects of Emissions from Diesel Engines, edited by Lewtas, J., Elsevier Biomedical, New York, Amsterdam and Oxford : 3-14, 1982.
- 4) Schuetzle, D., Sampling of vehicle emissions for chemical analysis and biological testings Environ. Health Perspectives, 47 : 65-80, 1983.
- 5) Rosenkrang, H.S., E.C. McCoy, R. Mermelstein and W.T. Speck, A cautionary note on the use of nitro reductase-deficient strains of Salmonellas typhimurium for the detection of nitroarenes as mutagens in complex mixtures including diesel exhausts, Mutation Res., 91 : 103-105, 1981.
- 6) Pitts Jr., J.N., D.M. Lokensgard, W. Harger, T.S. Fisher, V. Mejia, J.J. Schuler, C.M. Scorziell and Y.A. Katzenstein, Mutagens in diesel exhaust particulate, Mutation Res., 103 : 241-249, 1982.
- 7) Nachtman, J.P., X. Xiao-bai, S.M. rapaport, R.E. Talcott and E.T. Wei, Bull. Environm. Contam. Toxicol. 27 : 463-466, 1981.
- 8) 조강래, 김양균, 엄명도, 김종훈, 시내버스 매연방지를 위한 촉매산화 여과장치의 실용화 방안, 한국대기보전학회, 5(1) : 79-87, 1989.
- 9) 허문영, 최성규, 유기선, 손동헌, 마우스 골수 소핵시험에 의한 디젤분진, HgCl₂ 및 Pb(Ac)₂의 유전독성 효과, 한국대기보전학회, 5(1) : 62-67, 1989.
- 10) Schimid, W., The micronucleus test, Mutation Res., 31, 9-15, 1975.
- 11) Kotin, P., Falk, H.S., Thomas, M., Aromatic hydrocarbones III. Presence in the particulate phase of diesel engine exhaust and the carcinogenicity of diesel exhaust extracts, Arch. Indust. Hlth., 11 : 113-120, 1955.
- 12) Matsushita. Hidetsurn, Formatrom, distribution and mutagenicity of nitroarenes and their related compounds, Toxicology Forum, 6(4) : 356-384, 1983.
- 13) Schuetzle, D., F.S.-C. Lee, T.J. Prater and S.B. Tejada, The identification of polynuclear aromatic hydrocarbon(PAH) derivatives in mutagenic fractions of diesel particulate extracts, Intern. J. Environ. Anal. Chem., 9 : 93-114, 1981.
- 14) Tsuchimoto, T. and Metter B.E., In vivo cytogenetic screening methods of mutagens with special references to micronucleus test, Arch toxicol., 42 : 239, 1979.
- 15) 조강래, 김양균, 엄명도, 국산 diesel기관위의 오염물질 배출특성에 관한 연구, 대기보전학회지, 1 : 83, 1985.
- 16) Schuezle, D., Frank, S.C., The identification of polynuclear aromatic hydrocarbon derivatives in mutagenic fractions of diesel particulate extract, Intern. J. Environ. Anal. Chem., 9 : 93, 1981.