

Benzidine dihydrochloride에 의한 Chinese hamster lung 세포의 적응반응

맹승희¹ · 정해원² · 이권섭¹ · 이용복¹ · 정호근¹ · 유일재¹
¹한국산업안전공단 산업안전보건연구원 산업화학물질연구센터
²서울대학교 보건대학원

Adaptive Response in Chinese Hamster Lung Cells by Benzidine Dihydrochloride

Seung Hee Maeng¹, Hai Won Chung², Kwon Seob Lee¹, Yong Mook Lee¹, Ho Keun Chung¹ and Il Je Yu¹
¹Center for Occupational Toxicology, Occupational Safety & Health Research Institute, Korea Occupational Safety & Health Agency, Yusong-gu Moonji-dong 104-8, Daejeon, 305-380
²Department of Molecular Epidemiology, School of Public Health, Seoul National University, 28 Yeon-Kun dong, Chongro-gu, Seoul, 110-460, Korea

(Received October 20, 2001 / Accepted December 1, 2001)

ABSTRACT : We studied adaptive response in CHL cells by benzidine dihydrochloride, a derivative of benzidine, which was a major mutagenic agent in dye industry. Chromosome aberration analysis was used for the identification of adaptive response to this mutagen. Adaptive and reactive doses were confirmed by cell proliferation rate curve. Cell proliferation rate curve was obtained from the mitotic indices of cells treated with various concentrations of benzidine dihydrochloride for 24 hours. Marked adaptive responses to benzidine dihydrochloride in the induction of chromosome aberration were observed in CHL cells by pre-treatment with low concentrations of benzidine dihydrochloride (0.0047 mg/ml or 0.0094 mg/ml) for 24 hours following post-treatment with high concentrations (0.0187, 0.0375, 0.075, 0.15 mg/ml) for 24 hours. These adaptive responses were found mostly in the type of chromatid breaks and chromatid exchanges. There is no difference in these results between two adaptive doses, 0.0047 mg/ml and 0.0094 mg/ml. The amount of adaptive response, however, was dependent on post-treatment doses.

Keywords : Adaptive response, Benzidine dihydrochloride, Chromosome aberration

서 론

산업적으로 사용되는 화학물질의 수가 해마다 늘어가는 동안 이들 많은 화학물질 중 발암성물질과 발암의 초기적 변이원 DNA의 손상 즉 돌연변이를 유발하는 성질을 가진 변이원성물질을 선별하고, DNA손상의 유발과 회복, DNA손상의 저해 및 이들 물질에 대한 적응 등의 일련의 세포 내 메카니즘을 밝혀 가는 것은 산업보건학적으로 볼 때 필수적이라 할 수 있다.

지금까지 확립된 변이원성시험법은 크게 나누면 유전자 수준의 변화(gene mutation), 염색체수준의 변화(chromosome aberration) 및 DNA수준의 변화(DNA damage)에 대한 방

법으로서 현재 경제협력개발기구(OECD)의 전문가들에 의하면 총 15종류의 유전독성시험의 가이드라인이 작성되어 있고 앞으로도 계속 새로운 시험법이 개발될 것으로 보인다(石館, 1991).

이들 중 염색체이상시험법은 사람을 포함한 고등동물의 세포를 배양하는 기법이 개발된 이래 방사선 및 화학물질의 유전독성을 연구하는데 유용하게 이용되어 왔다. 또한 미생물을 이용한 Ames시험법과 함께 화학물질의 유해성을 초기에 탐색하는 대표적인 단기의 시험관내 시험방법으로 널리 쓰이고 있어 미국, 일본 및 우리나라의 규제를 위한 시험가이드라인 등에 제시되어 있는 화학물질 유해성 시험방법의 하나이다.

벤지딘은 염료의 제조에 사용되었던 산업화학물질로 현재에는 제조수입 또는 사용을 금지하는 물질이기도 하지만 실험실에서의 혈액검출과 우유에서의 과산화수소의 검출시도

*To whom correspondence should be addressed

사용되는 물질이다. 또한 시안화수소와 황산염의 검출에 이용되기도 하며 니코틴의 양적인 검출에 이용되기도 한다. Haley(1975)와 IARC(1982)의 보고에 의하면 벤지딘은 마우스, 햄스터, 개 등의 동물실험결과 방광암을 유발하는 발암 물질이며 이는 산업장에서 벤지딘에 폭로된 근로자를 대상으로 한 역학조사 등의 결과로도 확인될 수 있었다(Ferber, *et al.*, 1976; Tsuchiya, *et al.*, 1975; Zavan, *et al.*, 1973).

벤지딘은 대사활성화를 시켰을 때 살모넬라균 TA1538에 변이원성을 나타내었으며, *E. coli* pol A 시험과 prophage induction 시험에서는 음성의 결과를 나타내었다. 또한 시험 관내 실험 및 생체의 실험에서 DNA손상을 유발함이 보고되었다(IARC, 1982). NTP의 보고에서는 벤지딘은 살모넬라 시험에서 양성 결과를 보였고, CHO세포를 이용한 실험에서는 염색체이상과 자매염색체교환의 증가양상이 보고되기도 하였다.

우리나라에서 벤지딘의 사용을 살펴보면 1945년 이후 벤지딘 제조공장이 하나 세워졌고, 1960년대에 이후 많은 공장들이 세워졌다가 없어지곤 하였다. 산업안전보건법 및 유해물질관리법에 의하면 제조, 수입 또는 사용을 금지하는 유해물질로 벤지딘과 그 염을 정하고 있으나 벤지딘 염산염은 금지규정에서 제외됨으로써 사실상 벤지딘의 제조 및 사용이 법적으로 허용되고 있는 상황이다.

적응반응(adaptive response)이란 낮은 농도의 방사선 또는 변이원성 화학물질에 노출된 후 높은 농도의 동일한 돌연변이원 또는 작용기전이 비슷한 돌연변이원에 노출된 경우 나타나는 보호효과로서, 이에 관한 연구는 1977년 *E. coli*에서 그 현상이 보고된(Samson & Cairons, 1977) 이래 동물세포 및 식물세포에서도 확인된 바 있고(Heindorff *et al.*, 1987; Hendrikse, *et al.*, 2000; Samson & Schwartz, 1980; Swant, *et al.*, 2001; Wolff, *et al.*, 1991; Zhang, 1995), 그 기전은 특히 알킬화 물질(alkylating agent)에 대해서 많이 밝혀져 있어 DNA methyltransferase와 같은 적응에 관계되는 단백질이 생성됨이 보고된 바 있다(Yarosh *et al.*, 1984).

Ikushima(1987,1989)의 보고에 의하면 방사성의 thymidine에 적응된 Chinese hamster V79세포는 그 후의 높은 선량의 X선에 대해 방어효과를 나타내었으며, 감마선에 적응된 세포는 mitomycin C 및 자외선에 대해 내성을 나타내어 자매염색체교환빈도 및 소핵빈도의 감소를 나타내었다. 또한 Laval 등(1984)은 methylmethanesulfonate(MMS)와 N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG)등에 적응된 세포에서, Samson 등(1977)은 MNNG에 적응된 세포에서 돌연변이유발과 자매염색체교환의 빈도가 감소하는 것을 관찰하였다. 또한 Kim 등(1992)은 bleomycin 및 cadmium에 의한 CHO세포에서의 적응반응을 관찰하였으나 mitomycin

C에서는 관찰하지 못하였다.

위의 보고들과는 상이하게 적응반응현상의 관찰을 목적으로 배양세포를 대상으로 하여 MNNG등을 이용한 자매염색체교환 등의 돌연변이실험결과 의도했던 적응반응현상을 관찰하지 못한 예도 소수 있다(Anderson *et al.*, 1980; Chung & Kim, 1992). 따라서 적응반응현상은 연구대상 세포의 종류, 사용한 물질에 따라 또 이용하는 실험방법에 따라 그 결과가 상이하였다.

한편 Hendrikse 등(2000)은 wild type p53을 가진 lymphoblast 세포주인 TK6 및 비활성적 p53을 가진 돌연변이 monocytic leukemia 세포주인 u937세포에 대해 방사선에 의한 적응반응을 관찰하였는데 이때 지표로 p53 및 p21 protein level과 apoptosis, 그리고 소핵을 관찰하였다. 여기에서 연구자들은 방사선에 의한 적응반응은 wild type p53이 없을 때에만 일어났으며 소량의 방사선 폭로와 잇단 다량의 방사선으로 야기되는 apoptosis와 세포유전적 손상에 있어서 적응반응에 의한 보호기능은 관찰할 수 없었음을 보고하였다.

이에 본 연구에서는 변이원성 시험방법의 하나인 염색체이상시험법으로써 CHL세포에 우리나라에서는 아직 작업환경내에서 폭로될 수 있는 발암물질이며 돌연변이원인 benzidine dihydrochloride를 처리하였을 때 적응반응현상이 존재하는지의 여부를 확인함으로써 작업환경내의 발암원 및 돌연변이원에 대한 적응반응에 관한 자료를 축적하고자 하였다. 또한 염색체이상시험법이 벤지딘에 대한 적응반응연구에 적합한 실험방법인지를 확인하며 더 나아가 이들 물질의 적응반응기전의 규명 및 DNA 손상의 저해방법의 개발 등을 위한 기초적 정보를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

연구대상

본 연구에서 *in vitro*의 염색체이상시험을 실시하는데 있어 사용한 배양세포는 Chinese hamster lung cell(CHL 세포)이었다.

연구방법

세포배양

본 연구에서 사용한 CHL세포는 CO₂ 배양기에서 10% fetal bovine serum(GIBCO)과 10 µg/ml의 penicillin과 10 µg/ml의 streptomycin이 포함된 MEM 배지(minimum essential medium, GIBCO)에 단층 배양하여 사용하였다.

세포증식억제시험

CHL세포를 이용하여 염색체이상시험을 실시하기 위한

benzidine dihydrochloride의 농도결정과 적응반응 실험시 적응농도 및 적응 후 처리농도 즉 반응농도를 결정하기 위하여는 0.3 mg/ml부터 공비 2로써 8단계 농도의 benzidine dihydrochloride를 처리하였다. 이때 작성한 염색체표본에서 세포분열지수(mitotic index)를 측정함으로써 세포증식곡선을 산출하였다. 이때 실험방법으로는 CHL세포 20,000개를 60 mm의 세포배양용 petri dish에 심은 후 3일간 배양하여 각 농도단계의 benzidine dihydrochloride를 처리, 24시간 배양한 후 표본을 작성하고 Giemsa 염색하여 관찰하였다. 이때 세포분열지수는 1000개의 세포 중 세포분열중인 세포의 수를 센 다음 백분율로 계산하여 구하였다.

농도별 염색체이상시험

본 시험에서 이용한 염색체이상시험방법은 石館 (1991)의 방법에 의하여 실시하였다.

이때 세포증식억제시험에서 결정한 투여농도 0.15, 0.075, 0.0375, 0.0187, 0.0094, 0.0047 mg/ml의 benzidine dihydrochloride용액을 3일간의 전배양시킨 CHL 세포에 처리, 24 시간 배양한 후 염색체표본을 작성, Giemsa 염색하여 구조적 염색체이상을 관찰 분석하였다. 이때 관찰한 세포는 중기세포(metaphase cell)로서 각 농도 당 2개의 표본에서 100개씩 관찰하였다.

염색체이상에서의 적응반응

세포증식억제시험에서 결정한 적응 농도인 아주 낮은 용량의 benzidine dihydrochloride를 3일간 전배양시킨 CHL세포에 먼저 처리하여 24시간 배양시킴으로써 세포들을 적응시켰다. 적응된 이들 세포를 PBS(phosphate buffered saline, pH 7.4)로 2회 세척한 다음 신선한 MEM 배지를 넣고 반응농도로 결정된 보다 높은 농도의 동 물질을 농도별로 각각 투여한 후 다시 24시간 추가 배양하여 염색체표본을 작성, 염색체이상을 관찰 분석하였다. 이 관찰치와 농도별로 단 회 투여하여 분석한 염색체 이상빈도로부터 이론적으로 추정할 수 있는 염색체 이상 빈도수를 비교함으로써 benzidine dihydrochloride의 세포 적응성을 관찰하였다. 이때 적응농도는 세포증식억제시험결과 음성 대조군에서 관찰된 세포증식율과 거의 같은 세포증식율을 보였을 때의 benzidine dihydrochloride의 농도로 두 단계를 취하였는데 이는 각각 0.0094 mg/ml 및 0.0047 mg/ml이었다. 또 적응 후 처리한 반응농도는 세포증식억제시험에서 세포치사가 일어나기 전의 최고농도로 부터 4단계 농도인 0.15, 0.075, 0.0375, 0.0187 mg/ml이었다.

염색체표본의 작성

투여시간이 완료되었을 때 배양세포에 colcemid(0.2 µg/ml, GIBCO)을 가한 후 2시간 배양하여 세포수집을 하였으며 이들 세포는 저장액(0.075 M KCl)으로 처리하고

Carnoy 고정액(methanol:acetic acid = 3:1)에 3회 고정하여 염색체 표본을 작성하였다. 염색체이상의 관찰은 하나의 실험군에서 두개씩 작성한 표본에서 각각 100개씩의 중기세포 내 염색체의 구조적 이상을 관찰하여 염색체이상 빈도수를 산출하였다.

통계적 검정

각 실험군의 염색체이상빈도수의 비교는 짝 비교의 t-검정으로 실시하였다.

결 과

세포증식율곡선 및 농도의 결정

0.3 mg/ml부터 공비 2로 8단계의 농도 순으로 benzidine dihydrochloride를 처리하였을 때의 세포분열지수와 이로부터 산출한 세포 증식율은 Table 1 및 Fig. 1과 같았다. 0.3 mg/ml의 농도로 대상물질을 투여하였을 때에는 세포치사효과로 분열중인 세포가 거의 없었으며 50%의 세포증식억제 현상은 benzidine dihydrochloride의 농도 약 0.05 mg/ml

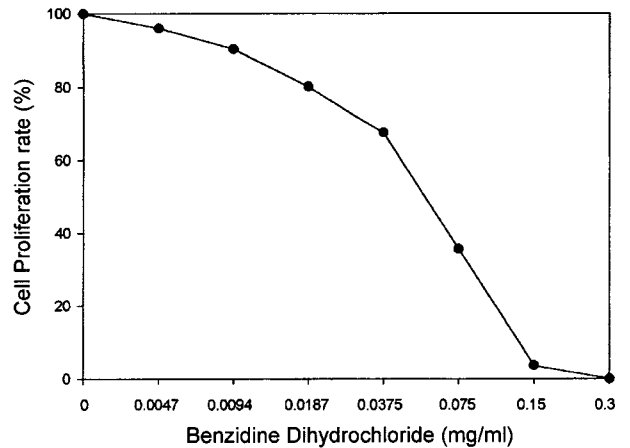


Fig. 1. Cell proliferation rate curve of CHL cells treated with benzidine dihydrochloride.

Table 1. Mitotic Indices of CHL cells treated with various concentrations of benzidine dihydrochloride

Concentration (mg/ml)	Mitotic Index (%)
0.3	0.0
0.15	0.5
0.075	4.5
0.0375	8.5
0.0187	10.1
0.0094	11.4
0.0047	12.1
0.0	12.6

에서 관찰되었다. 또한 0.15 mg/ml의 농도에서는 96.4%의 세포증식억제율을 보였으나 염색체이상빈도가 상당히 높은 것(약 30%)으로 나타나 본 연구에서는 0.15 mg/ml의 농도를 최고농도로 하는 염색체이상시험을 실시하였다.

또한 적응반응실험에 있어서 낮은 농도의 적응용량은 세포증식율이 90%이상으로 나타났던 0.0094 mg/ml(세포증식율 90.4%) 및 0.0047 mg/ml(세포증식율 96.0%)로 하였다. 반응시킬 농도는 그 이상의 3단계 농도를 모두 택하였다.

배양세포에서의 염색체이상

Benzidine dihydrochloride를 농도별로 투여하였을 때 염색체이상의 빈도는 Table 2와 같았다. 0.15 mg/ml의 농도에서 33.5%(+gap), 0.075 mg/ml에서 19.0%(+gap), 0.00375 mg/ml에서 8.0%(+gap)로 강한 양성의 염색체이상을 보였으며 투여농도 구배에 따라 염색체이상빈도가 증가하는 양상

Table 2. The frequencies of chromosomosome aberrations in CHL cells treated with benzidine dihydrochloride

Conc. (mg/ml)	pol	gap	ctb	cte	csb	cse	Total (-g)	Total (+g)
0.15	1.5	6.0	15.0	13.5	0.0	0.0	28.5	33.5
0.075	0.0	3.0	9.5	6.5	0.0	0.0	16.0	19.0
0.0375	0.0	2.0	3.5	2.5	0.0	0.0	6.0	8.0
0.0187	0.0	1.5	1.5	1.0	0.0	0.0	2.5	4.0
0.0094	0.0	0.0	1.0	0.5	0.0	0.0	1.5	1.5
0.0047	0.5	0.5	0.5	0.5	0.0	0.0	1.0	1.5
0.0	0.0	0.5	1.5	0.5	0.0	0.0	2.0	2.5

pol, polyploid; ctb, chromatid break; cte, chromatid exchange; csb, chromosomal break; cse, chromosomal exchange

즉 양 반응성(dose-response)을 보였다. 0.0094 및 0.0047 mg/ml의 농도에서는 음성대조군의 결과에 비해 전혀 염색체 이상빈도가 증가되지 않았다. 관찰된 염색체이상의 형태는 거의 모두 염색분체형으로 절단형(chromatid break:ctb)이 교환형(chromatid exchange: cte)보다 조금 많았다.

염색체이상에서의 적응반응

24시간동안 낮은 농도(적응용량)의 benzidine dihydrochloride에 적응시킨 세포에 보다 고농도(반응농도)의 같은 물질을 처리한 후 24시간 후에 염색체이상빈도를 조사한 결과 뚜렷한 적응반응을 관찰할 수 있었다(Table 3). 관찰된 염색체이상의 형태는 소수의 염색체형 이상이 관찰되기도 하였지만 거의 대부분이 염색분체형의 교환과 절단에 의한 이상이였다. 적응 후의 염색체이상빈도 또한 적응후의 반응농도의 구배에 비례하여 증가하는 것을 알 수 있었다. 적응농도가 0.094 mg/ml이었던 실험군(Table 3)에서 보면 적응 후 반응시킨 농도가 0.15 mg/ml인 경우 이론상의 기대치(적응농도에서 단회 처리한 때의 빈도수와 반응농도로 단회 처리한 때의 빈도수의 합)인 37.5%보다 훨씬 낮은 16.5%를 나타내어, 낮은 농도로 처리하였을 때 이미 염색체이상에 대한 수복기구가 생성되어 적응반응이 일어났음을 보여 주었다. 반응농도 0.075 mg/ml에서는 기대치 17.5%에 비해 11.5%, 0.00375 mg/ml에서는 기대치 5.0%에서 2.5%, 0.0187 mg/ml에서는 기대치 2.5%에서 1.0%로 각각 염색체이상에서의 적응반응이 일어났음을 보여 주었다. 적응농도 0.0047 mg/ml (Table 3)에서도 같은 현상을 나타내어 결과적으로 두개의

Table 3. The frequencies of chromosome aberrations in CHL cells pre-exposed to the low doses of benzidine dihydrochloride followed by high doses

Pretreatment (mg/ml)	Posttreatment (mg/ml)	Percent of aberrant cells	Structural aberrations/100 cells				
			Chromatid type		Chromosome type		gap
			exchange	break	exchange	break	
0	0.0000	1.5	0.5	1.0	0.0	0.0	0.5
0	0.0187	3.0	1.0	1.0	0.0	0.0	1.0
0	0.0375	5.5	2.5	3.0	0.0	0.0	2.0
0	0.0750	18.0	6.0	8.5	0.0	0.0	3.5
0	0.1500	38.0	16.5	12.5	0.0	0.0	9.0
0.0094	0.0000	1.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.1
0.0094	0.0187	1.0 (2.5)*	0.5	0.5	0.0	0.0	0.0
0.0094	0.0375	2.5 (5.0)*	1.5	1.0	0.0	0.0	0.0
0.0094	0.0750	11.5 (17.5)*	5.0	5.5	0.0	0.5	0.5
0.0094	0.1500	16.5 (37.5)*	3.0	9.0	0.0	0.5	4.0
0.0047	0.0000	2.5	0.5	0.5	0.5	0.0	1.0
0.0047	0.0187	1.5 (4.0)*	0.5	0.0	0.0	0.0	1.0
0.0047	0.0375	2.5 (6.5)*	0.5	1.0	0.0	0.0	1.0
0.0047	0.0750	11.0 (19.0)*	7.0	3.5	0.0	0.0	0.5
0.0047	0.1500	17.5 (39.0)*	7.0	7.5	0.0	0.5	2.5

cte, chromatid exchange; ctb, chromatid break; cse, chromosomal exchange; csb, chromosomal break The number of parentheses indicate the expected frequency. * The value is significantly lower than the expected (p<0.05).

적응농도 모두에서 또한 적응 후 반응시킨 모든 농도 단계에서 뚜렷한 적응반응을 관찰할 수 있었고 그 양상은 두개의 적응농도에 따라서 별 차이가 없는 것으로 나타났다. 그러나 적응반응정도는 적응 후 처리했던 반응농도의 농도구배에 따라 보다 높은 농도일수록 더 뚜렷하였음을 관찰할 수 있었다.

고 찰

벤지딘은 염료제조시 사용되는 화학물질로서 1980년 NIOSH에서 벤지딘을 이용하여 제조한 염료들에 대한 동물실험과 이들 염료를 사용하는 근로자들에 대한 역학조사를 통해 밝혀진 발암성 자료들을 보고한 바 있다. 벤지딘 자체도 사람에게 있어 요로 방광암을 일으키며 다양한 종류의 동물에서 종양을 유발하는 물질로 오래 전부터 알려져 왔다(Haley, 1975). 벤지딘과 이들 염료를 실험동물에 투여했을 때 이들 동물의 요 중에 발암성의 방향족 아민류가 분비됨이 알려져 이 요에서의 대사산물에 대한 변이원성도 밝혀져 있고(Bos, *et al.*, 1984; Tanaka, *et al.*, 1981), 벤지딘 자체도 시험관내 시험에서 대사활성화시 미생물을 이용한 변이원성 실험을 비롯하여 CHO세포에서의 염색체이상시험, 자매염색체교환 및 DNA 손상시험 등에 양성으로 반응함이 보고되었다. 본 연구실험결과 benzidine dihydrochloride를 CHL세포에 농도별로 처리했을 때 양반응성과 함께 강한 염색체이상을 나타내어 기존의 free benzidine에 대한 결과와 같은 양상이었다. 현재까지 알려진 결과로는 벤지딘의 발암과정에 기여하는 주요 대사산물은 N-acetylbenzidine으로 이 물질은 흰쥐의 간 내에서 DNA adduct를 형성하며 이 DNA adduct는 N-acetylbenzidine의 acetyl group을 포함하고 있다(Green, *et al.*, 1987; Kennelly, *et al.*, 1984). 본 시험에서 benzidine dihydrochloride의 강한 염색체이상은 대사활성화 시키지 않은 상태에서 유발되었으므로 benzidine dihydrochloride 자체가 직접 변이원으로 작용함을 알 수 있었다.

이와 같이 벤지딘에 대한 발암성 및 변이원성과 그 발암기전까지 다양하고 많은 연구결과가 있어 벤지딘의 사용이 점차 금지되고 보호대책아래 제한된 범위 내에서 사용이 이루어져 가고 있지만 지금까지 벤지딘에 직업적으로 폭로된 근로자들에 있어 방광암 등이 발생할 수 있다는 위험성이 더욱 높아져 가고 있다. 직업적으로 이 물질에 폭로되어 방광암에 대해 높은 위험성을 갖는 사람의 수는 미국에서는 6,000명 이상이고 일본의 경우는 3,000명에 달하며, 중국의 경우는 2,500명에 이른다(Tanigawa, *et al.*, 1990). 우리나라의 경우 벤지딘에 직업적으로 폭로된 근로자에 대한 자료는 매우 불충분하고 또 우리나라에서는 산업안전보건법 및

유해물질관리법에 의해 벤지딘은 제조, 수입 또는 사용을 금지하는 물질로 정해져 있으나 벤지딘 염산염은 금지규정에서 제외되어 있으므로 사실상 그 사용이 법적으로 허용되어 있어 이들에 대한 위험성은 다른 나라에 비해 더욱 크게 안고 있다.

적응반응(adaptive response)에 관한 연구로는 Samson과 Cairns(1977)이 *E. coli*에서 DNA수복과 관련하여 연구하기 시작하여 CHO세포와 피부섬유모세포에서의 적응반응(Samson & Schwartz, 1980)에 대한 연구가 있었다. 이어서 저농도의 방사성의 thymidine을 비롯한 X선에 대한 사람의 임파구에서의 적응반응(Oliveri *et al.*, 1984; Wolff, 1988)이 연구되었고 그 후로는 이온화방사선에 대한 적응반응연구가 사람의 임파구 및 배양세포를 대상으로 계속되어져 왔다(Burkart *et al.*, 1989, 1990; Ikushima, 1987, 1989; Wang, *et al.*, 1991; Wolff *et al.*, 1988). 이외의 적응반응 연구는 알킬화 물질(alkylating agent)와 bleomycin, mitomycin C등에 대한 것으로 연구대상이 되었던 화학물질의 수는 극히 적은 편이며 특히 벤지딘에 대한 적응반응현상에 관한 연구보고는 아직 찾아 볼 수 없었다.

한편 Kim 등(1992)은 mitomycin C와 bleomycin등을 이용한 세포적응반응연구에서 적응반응현상은 특정세포에서 특정한 물질에 대해 특정한 시기에만 관찰되기 때문에 세포의 특성 및 사용한 물질의 종류와 투여농도 및 세포주기에 따라 그 결과가 상이하게 나타난다고 하였다.

Barquinero 등(1995)은 X선 및 감마선에 직업적으로 노출되어 있는 사람들의 혈액림프구에 실험적으로 방사선을 조사시킨 경우와 직업적으로 노출된 적이 없는 사람들의 혈액림프구에 실험적으로 방사선을 조사시킨 경우를 비교할 때 전자의 경우에서 이동원 염색체의 빈도가 더 낮았음을 보고함으로써 직업적 폭로에 의한 적응반응을 보고하였다.

본 연구에서 낮은 농도의 benzidine dihydrochloride에 적응된 CHL세포를 높은 농도에 반응시켰을 때 염색체이상에서의 뚜렷한 적응현상을 관찰할 수 있었다. 특히 교환과 절단을 포함한 염색분체형의 염색체이상빈도가 적응반응에 의해 감소한 것으로 나타났는데 반응농도의 투여를 세포주기 중 G1기에 처리했을 경우의 bleomycin과 mitomycin C에 의한 적응반응과 전리방사선에 의한 적응반응이 주로 염색체형의 염색체이상에서 보고된 것(Kim *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1991)과는 상이하였다. 또한 G2기에 전리방사선이나 bleomycin을 처리한 경우 그리고 알킬화 물질이나 화학물질을 이용한 연구에서 염색분체형의 염색체이상빈도에서 적응반응을 보였던 결과와는 일치하는 것이었다. Bleomycin과 전리방사선은 염색체이상의 유발형태 즉 DNA상에 유발되는 손상은 DNA의 양가닥 절단(Double Strand Break)에 의해

염색체 이상을 일으키고, mitomycin C의 경우는 DNA-crosslink가 형성되어 염색체 이상을 일으키며 이들 물질들에 서의 적응반응은 이러한 염색체 이상 유발과정에서의 특정한 DNA 수복기전으로써 발생한다는 기존의 결과들과 결부할 때 benzidine dihydrochloride는 bleomycin과 전리방사선 및 mitomycin C와는 다른 DNA수복기전에 의해 적응반응을 나타낸다고 할 수 있다.

Bravard 등(1999)의 보고에 의하면 낮은 용량의 이온화방사선에 사람 림프구를 적응시켰을 때 방사선 조사 초기에 SOD, GST, glutathione peroxide, catalase 등 몇몇의 항산화 효소의 활성이 증가함을 관찰함으로써 이들 효소의 작용이 저용량 방사선에의 적응반응에 기여함을 보고하였다.

본 연구결과 CHL 세포를 대상으로 하였을 때 benzidine dihydrochloride는 대사활성화시키지 않은 상태에서 강한 염색체 이상을 유발하였으며 낮은 농도에 적응시킨 후 보다 높은 농도에 노출 시켰을 때에는 염색체 이상빈도에 있어서 뚜렷한 적응반응을 나타내었다. 앞으로는 벤지딘과 또는 화학적 유사물질에 의한 본 결과와 같은 적응반응에 대한 기전에 대한 연구가 추진되어야 할 것이다.

우리나라의 경우 벤지딘 염산염의 제조 사용이 일부 허용되고 있어 이 물질에 폭로된 근로자들에 대한 보건학적 평가의 필요성이 대두되고 있는 과정에서 특히 벤지딘은 방광암 등을 유발하는 발암물질로서 이 물질을 취급하는 근로자들에 대한 유전적 지표를 활용한 생물학적 모니터링이 요구된다. 이때 적응반응현상을 나타내는 모니터링시험방법을 이용하여 생물학적 모니터링을 실시할 경우 결과를 해석하는데 있어 세포내의 적응반응을 고려하여야 하며 결과에 대해 과소평가되지 않도록 하여야 할 것이다.

참고문헌

- Anderson, D., Fisher, P., Jenkinson, P.C. and Philips, B.J. (1980): Studies of the adaptive repair response in human lymphocytes and V₇₉ cells after treatment with MNNG and HNU. *Human Toxicol.* **7**, 337-341.
- Bos, R.P., Groenen, M.A.M., Theuws, J.L.G., Lleijsdekkers, C.M. and Henderson, P.T. (1984): Metabolism of benzidine-based dyes and the appearance of mutagenic metabolites in urine of rats after oral or intraperitoneal administration. *Toxicology* **31**, 271-282.
- Bravard, A., Luccioni, C., Moustacchi, E., Riyaud, O. (1999): Contribution of antioxidant enzymes to the adaptive response to ionizing radiation of human lymphoblasts. *Int. J. Radiat. Biol.* **75**, 639-645.
- Burkart, W. and Vijayalaxmi, T. (1989): Micro-dosimetric constraints on specific adaptation mechanisms to reduce DNA damage caused by ionizing radiation. *Radiation Protection Dosimetry* **31**, 269-274.
- Chung, H.W. and Kim, Y.J. (1992): Adaptive response in human lymphocytes by bleomycin and mitomycin C. *Korean J. Genetics* **14**, 161-172.
- Ferber, K.H., Hill, W.J., Cobb, D.A. (1976): An assessment of the effect of improved working conditions on bladder tumor incidence in a benzidine manufacturing facility. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* **37**, 61-68.
- Green, C.E., Hanco, V.P., Gordon, G.R., Peters, J.H. and Tyson, C.A. (1987): Acetylation/deacetylation (AC/DC) of aryl amines in human and rat liver. *Toxicology* **7**, 220-229.
- Haley, T.J. (1975): Benzidine revisited: a review of the literature and problem associated with the use of benzidine and its congeners. *Clin. Toxicol.* **8**, 13-42.
- Heindorff, K., Rieger, R., Schubert, I., Michaelis, A. and Aurich, O. (1987): Clastogenic adaptation of plant cells-reduction of the yield of clastogen-induced chromatid aberrations by various pre-treatment procedure. *Mutation Res.* **181**, 157-171.
- Hendrikse, A.S., Hunter, A.J., Keraan, M. & Blerkhorst, G.H. (2000): Effects of low dose irradiation on TK6 and U937 cells: induction of p53 and its role in cell-cycle delay and the adaptive response. *Int. J. Radiat. Biol.* **76**, 11-21.
- Ikushima, T. (1987): Chromosomal response to ionizing radiation reminiscent of an adaptive response in cultured Chinese hamster cells. *Mutation Res.* **180**, 215-221.
- Ikushima, T. (1989). Characterization of a cytogenetic repair induced by low-level ionizing radiation in cultured Chinese hamster cells. *Mutation Res.* **227**, 241-246.
- International Agency for Research on Cancer (1982): IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Vol 29, Some Industrial Chemicals and Dyestuffs, pp. 149-183/ IARC, Lyon, France.
- 石館 基(1991). 變異原性, 遺傳毒性, 毒性試驗講座 12, 地人書館.
- Kennelly, J.C., Beland, F.A., Kadlubar, F.F. and Martin, C.N. (1984): Binding of N-acetylbenzidine and N,N'-diacetylbenzidine to hepatic DNA of rat and hamster *in vivo* and *in vitro*. *Carcinogenesis* **5**, 407-412.
- Kim, Y.J., Han, J.H. and Chung, H.W. (1992): Adaptive response in CHO cells by bleomycin, mitomycin C and cadmium. *Kor. J. Env. Hlth. Soc.* **18**, 117-124.
- Laval, F. and Laval, J. (1984): Adaptive response in mammalian cells: Cross reactivity of different pre-treatments on cytotoxicity as contrasted to mutagenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **81**, 1062-1066.
- National Institute for Occupational Safety and Health (1980): Special occupational hazard review for benzidine-based dyes. Publication 80-109. National Institute for Occupational Safety and Health. Rockville, Md.
- Oliveri, G., Bodycote, J. and Wolff, S. (1984): Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine. *Science* **223**, 594-597.
- Samson, L. and Cairns, J. (1977): A new pathway for DNA repair in Escherichia coli. *Nature (London)* **267**, 281-283.
- Samson, L. and Schwartz, J.L. (1980): Evidence for an adaptive DNA repair pathway in CHO and human skin fibroblast cell lines. *Nature (London)* **287**, 861-863.
- Swant, S.G., Randers-Pehrson, G., Metting, N.F., Hall, E.J. (2001). Adaptive response and the bystander effect induced

- by radiation in c3h10t(1/2) cells in culture. *Radiat. Res.* **156**, 177-180.
- Tanaka, K., Mii, T., Marui, S., Matsubara, I. and Igaka, H. (1981): Mutagenicity of urinary metabolites of benzidine and benzidine-based azo dyes. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **49**, 177-185.
- Tanigawa, T., Araki, S., Ishiza, S., Morita, T., Okazaki, H. and Minato, N. (1990): Natural killer cell activity in workers exposed to benzidine and naphthylamine. *Br. J. Ind. Med.* **47**, 338-341.
- Tsuchiya, K., Okubo, T., Ishizu S. (1975): An epidemiological study of occupational 3 bladder tumors in the dye industry of Japan. *Br. J. Ind. Med.* **32**, 203-209.
- Wang, Z.Q., Saigusa, S. and Sasaki, M.S. (1991): Adaptive response to chromosome damage in cultured human lymphocyte primed with low doses of X-ray. *Mutation Res.* **246**, 179-186.
- Wolff, S., Afzal, V., Wiencke, J.K., Oliveri, G. and Michealis, A. (1988): Human lymphocytes exposed to low doses of ionizing radiation become refractory to high doses of radiation as well as chemical mutagens that induce double-strand breaks in DNA. *Int. J. Radiat. Biol.* **53**, 39-48.
- Wolffs, S., Jostes, R., Cross, F.T., Hui, T.E., Afzal, V., Wiencke, J.K. (1991): Adaptive response of human lymphocytes for the repair of radon-induced chromosomal damage. *Mutation. Res.* **250**, 299-306.
- Yarosh, D.B., Rice, M., Day III, R.S., Foote, R.S. and Mitra, S. (1984): O6-methylguanine DNA methyltransferase in human cells. *Mutation Res.* **131**, 27-36.
- Zavon, M.R., Hoegg, U., Bingham, E. (1973): Benzidine exposure as a cause of bladder tumors. *Arch. Environ. Health* **27**, 1-7.
- Zhang, L. (1995): Cytogenetic adaptive response induced by pre-exposure in human lymphocytes and marrow cells of mice. *Matation Res.* **334**, 33-37.